

SÉRIE A, N° 2767

N° D'ORDRE
3640

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR-ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre AUGEREAU

1^{re} THÈSE. — L'ADRÉNOCHROME ET SES DÉRIVÉS

ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 20 Juin 1950 devant la Commission d'Examen.

MM. E. AUBEL, *Président.*

CL. FROMAGEOT	}	<i>Examineurs.</i>
G. SCHAEFFER		
M ^{lle} E. LE BRETON		

SÉRIE A, n° 2767

N° D'ORDRE

3640

THÈSES

PRÉSENTÉES

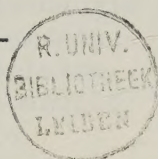
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR-ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Pierre AUGEREAU



1^{re} THÈSE. — L'ADRÉNOCHROME ET SES DÉRIVÉS

ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOCHIMIQUE

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 20 Juin 1950 devant la Commission d'Examen.

MM. E. AUBEL, *Président.*

Cl. FROMAGEOT	}	<i>Examineurs.</i>
G. SCHAEFFER		
M ^{lle} E. LE BRETON		



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547113_0027

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

Doyen M. A. CHATELET

Professeurs:

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
A. DENJOY	T	Théorie des Fonctions
L. LUTAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique
Robert LEVY	T	Physiologie comparée
Henri VILLAT ...	T	Mécanique des fluides et applications
Ch. JACOB	T	Géologie
P. PASCAL	T	Chimie générale
Mme RAMART-LUCAS	T	Chimie organique
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale
DE BROGLIE	T	Théories physiques
JOB	T	Chimie générale
PRENANT	T	Anatomie et histologie comparées
COMBES	T	Physiologie végétale
GARNIER	T	Géométrie supérieure
PERES	T	Mécanique rationnelle
HACKSPILL	T	Chimie minérale
LAUGIER	T	Physiologie générale
TOUSSAINT	T	Technique Aéronautique
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.)
G. RIBAUD	T	Hautes températures
CHAZY	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste
CROZE	T	Physique théorique et physique céleste
DUPONT	T	Théories chimiques
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral
BARRABE	T	Géologie structurale et géologie appliquée
VAVON	T	Analyse et mesures chimiques
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique
Jacques BOUCART.	T	Géographie physique et Géologie dynamique
AUBEL	T	Chimie biologique
Mme JOLIOT-CURIE	T	Physique générale et Radioactivité
PLANTEFOL	T	Botanique
CABANNES	T	Recherches physiques
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité
MONNIER		Physiologie générale
PIVETEAU	T	Géologie
ROCARD	T	Physique

H. CARTAN	T	Mathématiques générales
SCHAEFFER	T	Physiologie des fonctions
LAFFITTE	T	Chimie (P.C.B.)
FAVARD		Calcul des probabilités et Physique-Mathématique
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.)
CHRETIEN		Chimie (P.C.B.)
P. DRACH		Zoologie
KASTLER		Physique
CHATELET	T	Arithmétique et théorie des nombres
EPHRUSSI	T	Génétique
WURMSER	T	Biologie physico-chimique
BAUER	T	Chimie-Physique
RIVIERE		Géologie (P.C.B.)
GAUTHERET		Biologie végétale (P.C.B.)
LUCAS		Physique
A. THOMAS		Evolution des êtres organisés
ARNULF		Optique appliquée
MAX MORAND		Physique
SOLEILLET		Physique
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides
DANJON	T	Astronomie
FROMAGEOT	T	Chimie Biologique
LAPORTE	T	Physique générale et Radioactivité
JANET		Mathématiques générales
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN		Biologie animale (P.C.B.)
EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.)
DE CUGNAC		Biologie végétale (P.C.B.)
LAVAL		Physique (P.C.B.)
Mlle CAUCHOIS		Chimie-Physique
THELLIER		Physique du globe
AUDUBERT		Electrochimie
L'HERITIER		Génétique
GRIVET	T	Radio, Electricité
PONCIN		Mécanique des fluides
THIRY	T	Mécanique appliquée
DUBREIL		Mathématiques générales
QUELET		Chimie (P.C.B.)
CAGNIARD		Géophysique appliquée
CHAMPETIER		Chimie appliquée
CUVILLIER		Géologie structurale et Géologie appliquée
JUNG		Pétrographie
TRILLAT		Physique (P.C.B.)
WIEMANN		Chimie (P.C.B.)
LICHNEROWICZ		Mathématiques
JACQUINOT		Physique (P.C.B.)
VASSY		Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES		Théories Physiques

Secrétaire Ch. MONIER.

L ' A D R E N O C H R O M E
E T S E S D É R I V É S .

Etude Chimique et Biochimique.(*)

par

Pierre AUGEREAU

(*) Thèse de Doctorat ès-Sciences - Paris, Juin 1950.

Le Professeur G. SCHAEFFER, Professeur de Physiologie à la Faculté des Sciences, dans le laboratoire duquel je travaille comme Attaché de Recherches, avait demandé en 1947 au Docteur B. MINZ de m'associer à ses travaux de pharmacologie.

Le Docteur B. MINZ venait de publier une nouvelle observation d'effets hypotenseurs à la suite d'injection d'adrénaline oxydée : "une solution aqueuse d'adrénochrome, exposée à la lumière, à une température et à un pH déterminés, acquiert des propriétés qui rappellent celles des produits cholinergiques" (5).

Reprenant cette observation pharmacologique, nous n'avons pas retrouvé la chute de pression artérielle. Des résultats contradictoires étaient obtenus sur des préparations neuro musculaires et sur les organes isolés ; seule la contraction de la musculature lisse de l'intestin était retrouvée régulièrement, mais cette contraction n'est pas spécifique : c'est le mode de réponse de cet organe aux agents les plus divers. De plus, en réponse à une addition de la solution devant contenir le produit actif, l'intestin répondait souvent par une contraction d'amplitude variable pour une même dose au cours d'une même expérience. Ce test présentait donc une indétermination et ne pouvait permettre à lui seul de faire des hypothèses sur les transformations biochimiques subies par l'adrénaline à l'intérieur des cellules. Quant aux résultats contradictoires obtenus sur les autres organes ou préparations, d'abord il n'était pas prouvé que l'adrénochrome utilisé dans les essais fut exempt d'adrénaline, mais surtout, il nous semblait qu'ils devaient être attribués à la complexité des solutions étudiées.

L'adrénochrome dont la formation constitue la première étape de l'oxydation catalytique de l'adrénaline, devait donner lieu à la formation de toute une gamme de produits alors que, d'après l'opinion classique, il est admis qu'il se transforme seulement en pigments insolubles noirâtres, les "mélanines", considérées comme le stade ultime et unique de l'oxydation.

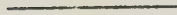
Par conséquent, l'étude physiologique devait être précédée d'un travail chimique en vue de définir les divers stades de l'oxydation de l'adrénaline et d'isoler des molécules chimiquement définies. C'est pourquoi, dès 1948, je fus amené à interrompre les recherches pharmacologiques et physiologiques pour m'attacher au problème chimique et biochimique de l'adrénochrome et de ses dérivés.

* * *

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
L'ADRENOCHROME	
Mécanisme de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome	
Préparation et propriétés physiques.....	4
Dérivés de l'adrénochrome	7
Structure et transpositions.....	11
Partie expérimentale.....	14
REDUCTION DE L'ADRENOCHROME	
Mécanisme et produits de la réduction.....	18
Système d'oxydo-réduction.....	21
Partie expérimentale	25
OXYDATION ET POLYMERISATION DE L'ADRENOCHROME	
Mécanisme de l'oxydation et de la mélanisation.....	29
Polymères : les mélanines	37
Partie expérimentale	42
RESUME	52
TABLEAU DE LA CHIMIE DE L'ADRENOCHROME	
BIBLIOGRAPHIE.....	56

I N T R O D U C T I O N



INTRODUCTION

Le premier terme isolé de l'oxydation (par les phenoloxydases) de l'adrénaline, catalyseur d'oxydation cellulaire en même temps que médiateur chimique du système nerveux sympathique, est l'adrénochrome. C'est probablement à ce corps ou à ses dérivés qu'il faut attribuer certaines des actions biologiques de l'adrénaline.

L'importance de l'adrénochrome ressort de trois séries de recherches: 1°/- celles de ENGELHARDT (1) et de WAJZER (2) sur l'intervention de l'adrénochrome dans les phosphorylations. ENGELHARDT et SAKOV ont décrit l'arrêt de la glycolyse musculaire par l'adrénaline oxydée par la polyphénoloxydase. WAJZER a montré que l'adrénochrome arrêta la glycolyse musculaire en empêchant la formation de l'hexose diphosphate de HARDEN et YOUNG et catalysait la synthèse du glycogène à partir de l'ester de CORI. - 2°/- les recherches de GREEN et RICHTER (3) concernant le rôle de l'adrénochrome comme accepteur d'hydrogène fonctionnant de façon réversible dans les systèmes enzymatiques aérobie de deshydrogénation de l'acide lactique en acide pyruvique. GREEN et RICHTER envisagent l'adrénochrome comme pouvant intervenir dans les chaînes de transporteurs cellulaires. - 3°/- les recherches de BACQ et HEIRMAN (4) et les observations de MINZ. BACQ attribue les actions inhibitrices de l'adrénaline et, en particulier, les phénomènes d'inversion adrénalinique à "l'adrénoxine", produit hypothétique qui résulterait de l'oxydation de l'adrénochrome. MINZ et PLOTKA (5) observent la formation d'une substance également hypothétique, à activité cholinergique, dans les produits de dégradation de l'adrénochrome brut à l'air "la chromadrénine A".

Si, inversement, nous envisageons l'aspect chimique du problème, il apparaît que, des différents métabolismes possibles de l'adrénaline, c'est la cyclisation de la chaîne latérale qui semble, seule, capable de faire

apparaître des molécules douées d'une spécificité biochimique en rapport avec ces propriétés physiologiques attribuées à des produits de son métabolisme, dans les processus de respiration cellulaire.

L'adrénochrome présente un noyau indolique, noyau qui se retrouve dans des produits physiologiquement importants. D'autre part, en raison d'une analogie de structure entre le pigment rouge indolique de RAPER (6) et l'adrénochrome, celui-ci devrait pouvoir subir une transposition moléculaire identique. L'intérêt biologique de tels remaniements intramoléculaires serait de faire apparaître, par de faibles variations d'énergie libre, un ensemble de fonctions nouvelles sur le noyau indolique. On obtiendrait alors des molécules dont les associations de fonctions chimiques peuvent être rapprochées de celles de certaines vitamines et hormones stéroïques.

Ce sont ces considérations physiologiques, d'une part, biochimiques, de l'autre, qui nous ont incité à aborder l'étude chimique de l'adrénochrome et de ses dérivés.

* * *

L'état de nos connaissances sur la chimie de l'adrénaline et de l'adrénochrome est très peu avancé. En 1901, l'adrénaline est découverte par TAKAMINE, ADLER et G. BERTRAND ; en 1927, RAPER (6) étudie le pigment rouge qui se forme par oxydation de la tyrosine et en démontre la nature indolique. En 1930, RAPER (7) poursuivant ses travaux sur la "Tyrosinase - Tyrosine Reaction," établit un rapprochement entre ce produit et le pigment rouge qui se forme au cours de l'oxydation de l'adrénaline. En 1937, GREEN et RICHTER (3) isolent ce pigment : l'adrénochrome. Enfin en 1948, HARLEY-MASON (8) isole, par réduction de l'adrénochrome : le dihydroxy-5-6 N-méthylindole et le tétrahydroxy-2-3-5-6 N-méthyldihydro-2-3 indole.

* * *

Ce travail constitue la première étape de nos recherches. L'exposé en est divisé en trois parties. La première concerne l'adrénochrome et ses isomères. Elle s'attache à montrer la mobilité de cette molécule en milieu aqueux polaire et ionisé dont le rôle est essentiel dans les réactions

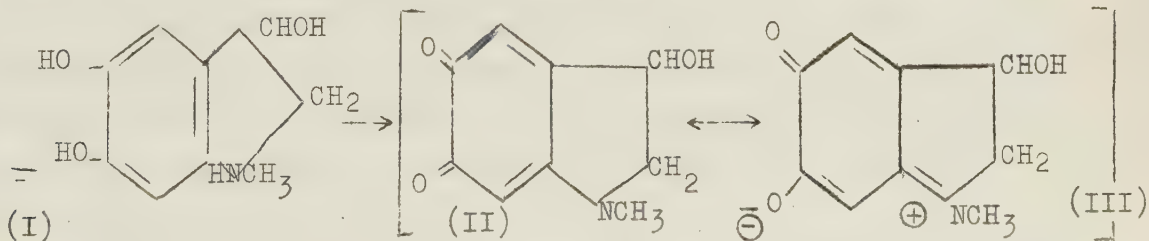
cellulaires. La seconde traite des produits et du mécanisme de la réduction de l'adrénochrome et du rôle de l'adrénochrome et de ses dérivés comme transporteurs d'hydrogène. La troisième partie développe le problème de la mélanisation et de ses rapports avec l'oxydation de l'adrénochrome : question confuse restée jusqu'ici sans réelle base expérimentale.

L ' A D R E N O C H R O M E

MECANISME DE LA FORMATION DE L'ADRENOCHROME

L'adrénaline (I) s'oxyde "in vitro" sous l'action des oxydases, comme la polyphénol oxydase (RAPER) (7) et la cytochrome indophénoloxydase (GREEN et RICHTER) (3), en donnant des pigments rouges. Ces pigments peuvent se transformer en pigments noirs insolubles qui sont désignés sous le terme de mélanines, par analogie avec des pigments trouvés chez les animaux et dont l'origine serait voisine et parfois identique. L'adrénaline s'oxyde de la même façon par oxydation catalytique par des ions métalliques, tels le cuivre et le fer : CHAIX, CHAUVET et JEZEQUEL (9) ont montré récemment que l'adrénaline n'était pas auto-oxydable, mais nécessitait pour s'oxyder, la formation préalable d'un complexe métallique. L'oxydation par des oxydants chimiques doux, tels l'iode (BOUVET) (10), l'oxyde d'argent (VEER) (11), le ferricyanure de potassium (WAJZER) (12) conduit aux mêmes produits.

La première observation de formation de pigment rouge a été faite par VULPIAN (13) en 1856, en oxydant par l'iode des extraits de surrénales. Depuis la découverte de l'adrénaline, l'oxydation de celle-ci a fait l'objet de nombreux travaux mais ce n'est qu'en 1937, que GREEN et RICHTER (3) par oxydation enzymatique de l'adrénaline réussissent à isoler sous forme cristallisée le pigment rouge : l'adrénochrome auquel ils ont attribué la formule quinonique (II). Récemment, HARLEY-MASON (8) a proposé la structure zwitterion - p - quinone imine (III). Ces deux structures ne diffèrent entre elles que par la distribution d'une ~~paire d'électrons~~.



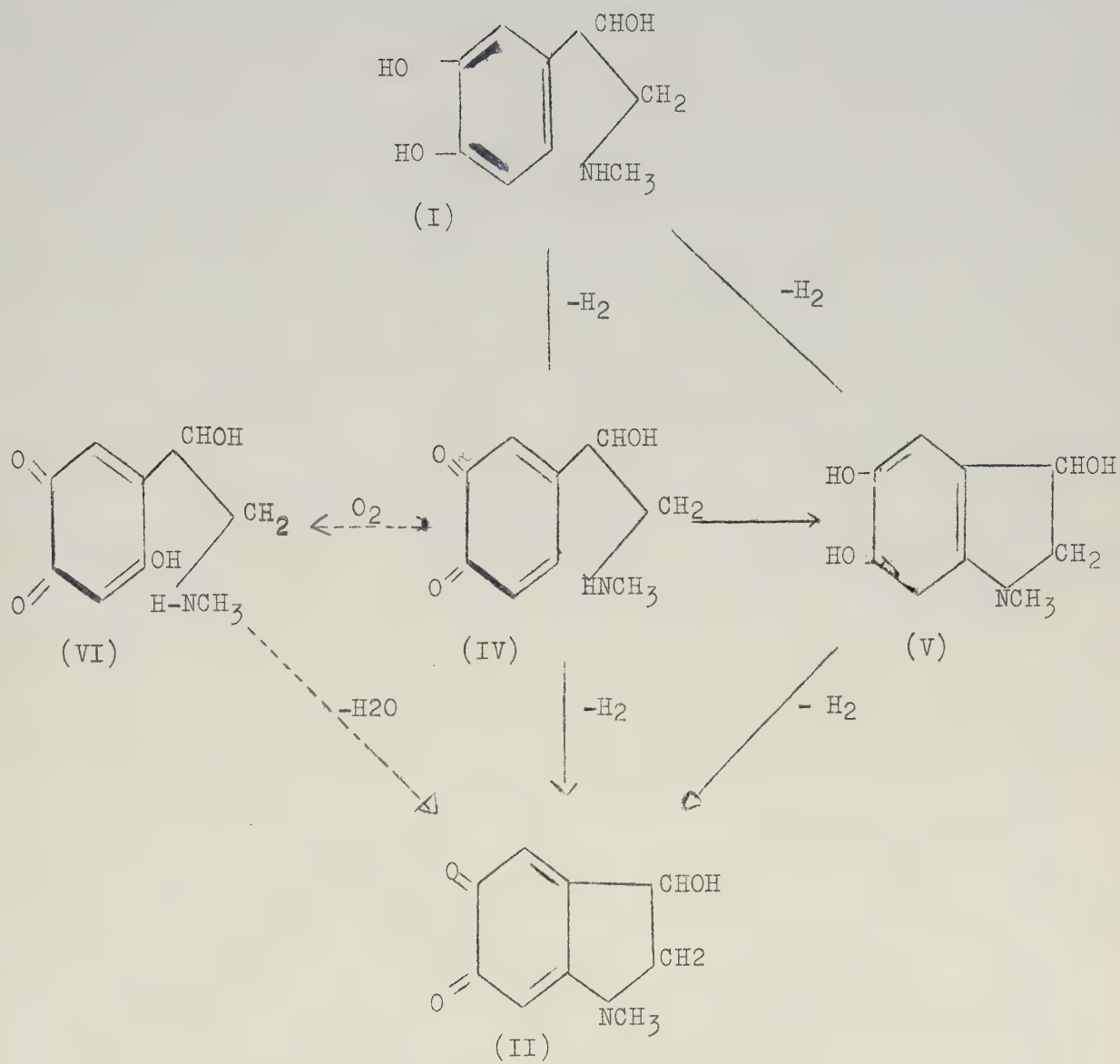
Le mécanisme de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome est discuté en raison de l'insuffisance de preuves expérimentales - les produits

intermédiaires sont, en effet, très instables et n'ont pas pu être isolés. Nous exposerons les différentes hypothèses de l'oxydation de l'adrénaline en adrénochrome.

GREEN et RICHTER (3) admettent que dans un premier stade, les groupements phénoliques de l'adrénaline sont oxydés en quinone (IV), puis dans un second stade, la chaîne latérale se cyclise (V). RAPER (6), travail auquel se réfèrent GREEN et RICHTER (3) envisage dans un cas analogue, celui de l'oxydation de la dihydroxyphénylalanine un remaniement intramoléculaire de la quinone, avec cyclisation par analogie avec les anilino-quinones ; dans ce cas, le leuco-adrénochrome (V) constituerait un stade intermédiaire de cette oxydation (on désigne habituellement sous terme de léuco-adrénochrome le diphenol correspondant à l'adrénochrome. Ce léuco-dérivé n'a pas été isolé). C'est le schéma adopté par LAVOLLAY (14). SCHAPIRA (15) a envisagé la formation d'une hydroxyquinone (VI) intermédiaire au lieu de leuco-adrénochrome par analogie avec l'oxydation du pyrocatechol (Notons que le mécanisme d'oxydation du pyrocatechol est encore discuté).

POLONOWSKI (16) envisage pour l'oxydation de l'adrénaline un passage direct de l'adrénaline au léuco-adrénochrome (V) par deshydrogénation entraînant la cyclisation. Cette cyclisation est suivie d'une oxydation des fonctions phénols en quinone. Il n'est pas donné de preuves expérimentales de ce mécanisme. DEROUAUX (17) et COHEN (18) appuient cette hypothèse du fait que les amines tertiaires soumises à l'oxydation ne se colorent pas. Ils en concluent que les O-quinones correspondantes ne se forment pas : la cyclisation préalable étant impossible. Mais, BALL et CHEN (19), qui ont étudié les systèmes d'oxydoréduction diphenol - quinone, ont montré qu'il n'y avait pas parallélisme entre la formation de produits colorés et celle des quinones, et même que ces produits colorés ne représentent pas le stade quinone, du fait que l'intensité de coloration est encore au maximum quand les potentiels d'électrodes indiquent la disparition totale de la quinone. D'autre part, UTEVSKY (20) et VERLY (21) bloquant l'hydrogène libre à l'azote de l'adrénaline par un groupement méthylénique obtiennent par oxydation la quinone. Donc, la formation préliminaire de quinone reste possible.

OXYDATION DE L'ADRENALINE EN ADRENOCHROME



Les stades intermédiaires entre l'adrénaline et l'adrénochrome, très instables n'ont jamais pu être isolés, mais ont fait l'objet d'un certain nombre de travaux. BALL et CHEN (19) considèrent l'adrénaline quinone (IV) comme la forme oxydée du système redox de l'adrénaline et trouvent qu'à pH = 7,66 et à 30°, la "half life" de la forme oxydée de l'adrénaline est seulement de 0,06 seconde. WIESNER (37), par la méthode polarographique, n'a pas retrouvé les résultats de BALL et CHEN concernant l'existence du système redox : Adrénaline - Adrénaline quinone. NEF (22) a montré que la présence d'une chaîne latérale ionisable augmente l'instabilité d'une O-quinone. Cette instabilité de l'adrénaline quinone, si elle existe montre l'impossibilité de son isolement sous forme libre. Pourtant RANGIER (23), après les travaux de BALL et CHEN, pensait l'avoir obtenu en oxydant l'adrénaline par PbO^2 à pH = 1,2 qui donne une solution jaune. SCHAPIRA (15) a montré que ce produit représente, en réalité, la forme jaune de l'adrénochrome à ce pH et vire au rouge par neutralisation, comme le constate RANGIER lui-même, par traitement de la solution par l'oxyde de zinc. D'autre part, GIJON (24) en 1945, par oxydation en milieu neutre et même alcalin de l'adrénaline obtient une solution rouge, sans affaiblissement appréciable de son action sur la pression artérielle et sur le muscle lisse. Il émet alors l'hypothèse que le pigment rouge est l'adrénaline quinone, qu'il nomme "adréno-érythrine". Ce résultat en contradiction avec tous les faits expérimentaux vérifiés est dû à une oxydation seulement partielle de l'adrénaline, et ne doit pas être pris en considération.

Le leucoadrénochrome (V) n'a également jamais été isolé. L'étude de la réduction de l'adrénochrome (cf. chapitre : réduction) montre l'instabilité de ce dérivé qui se transforme immédiatement par déshydratation en dihydroxy-5-6 N-méthylindole. Ce résultat, à priori, rend discutable la formation de leucoadrénochrome, au cours de l'oxydation de l'adrénaline, mais on doit réserver la possibilité qu'une déshydratation de la molécule qui se produit au cours de la réduction par voie chimique, n'ait pas lieu en milieu oxydant par suite peut-être d'une vitesse de réaction plus grande de l'oxydation sur la déshydratation.

PREPARATION & PROPRIETES PHYSIQUE) & CHIMIQUES

DERIVES DE L'ADRENOCHROME

La méthode actuelle de préparation de l'adrénochrome, en vue de son isolement sous forme cristallisée est l'oxydation de l'adrénaline par l'oxyde d'argent. Ce sont VEER (11) puis MAC CARTHY (25) puis ELLIS (26) qui ont utilisé l'oxyde d'argent pour obtenir l'adrénochrome à l'état cristallisé. Cette technique avait été précédemment employée par RAPER (7) pour préparer l'hallachrome à partir de la dopa et différents pigments rouges de structure analogue. L'oxyde d'argent est un oxydant doux assez spécifique de la transformation des diphénols en quinones (WILLS TATTER et PFANNENSTIEL) (27).

La technique de MAC CARTHY, avec quelques modifications, nous a donné de bons résultats. L'adrénaline est dissoute dans de l'alcool méthylique acidifiée par l'acide formique (2 pour 100) puis oxydée à la température du laboratoire par l'oxyde d'argent. La solution est filtrée et cristallisée par refroidissement. Le rendement de la réaction est faible, de l'ordre de 25 pour 100 au maximum, et dépend en particulier de la température à laquelle la solution est refroidie pour permettre la cristallisation. L'adrénochrome n'est recristallisable qu'avec un très mauvais rendement dans l'alcool méthylique (R = 15 pour 100). Nous n'avons pas réussi à améliorer ce rendement par l'emploi d'autres solvants ou de mélanges de solvants. Ce problème de la purification de l'adrénochrome s'était posé pour nous du fait que l'adrénochrome brut contient des traces d'adrénaline comme impuretés, ce qui en rend impossible l'étude pharmacologique. Nous l'avons résolu par chromatographie sur permutite qui retient les bases à coefficient de dissociation élevé, comme l'adrénaline. Les solutions doivent préalablement être neutralisées.

L'adrénochrome est un corps instable, qui se transforme en pigments insolubles bruns ou noirs que l'on désigne sous le terme général de mélanines. GREEN et RICHTER (3) notent que les cristaux d'adrénochrome même maintenus à l'abri de l'air se transforment en quelques semaines en un produit amorphe brun. Nous avons remarqué que cette transformation était catalysée par des traces d'humidité et qu'en réalité, en atmosphère sèche, les cristaux d'adrénochrome se conservent plusieurs mois sans altération. L'adrénochrome fond à environ 120° avec décomposition.

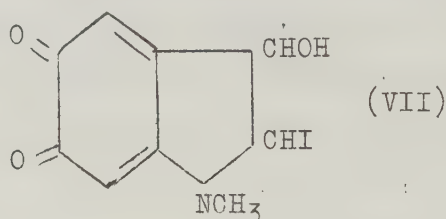
L'adrénochrome est soluble dans l'eau, dans l'alcool éthylique, dans l'alcool méthylique, dans l'acétone, dans la pyridine et pratiquement insoluble dans les autres solvants organiques, en particulier le benzène, l'éther et l'éther de pétrole.

Le spectre d'absorption de l'adrénochrome en solution aqueuse s'étend dans le visible de 4900 Å à 5400 Å, et dans l'U.V. comprend deux bandes principales situées vers 2850 Å et 3100 Å (ELLIS (26), BRACONNIER, le BIHAN et BAUDET (28), SCHAPIRA (15), BOUVET (10)).

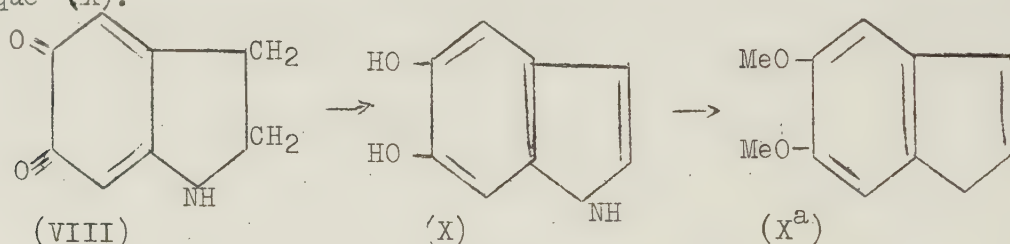
* * *

L'adrénochrome donne quelques dérivés stables de la fonction quinonique, mais il n'entre en réaction qu'avec une seule molécule d'hydroxylamine, de p-nitro-phénylhydrazine ou de semicarbazide : monooxime : P.F. = 178° semi-carbazone : P.F. = 203° décomp. (GREEN et RICHTER (3) VEER (11) BRACONNIER, LE BIHAN, BEAUDET (28)) - p. nitrophénylhydrazone : P.F. = 192° décomp. La 2-4 dinitrophénylhydrazine ne réagit pas. L'adrénochrome donne une combinaison bisulfite qui n'a pas été isolée (BOUVET(10)). Les tentatives de HARLEY-MASON (8) en vue de faire réagir une seconde molécule d'hydroxylamine ou de semicarbazide sur l'adrénochrome ont échoué. D'autre part, les O-quinones en général réagissent avec l'O phénylène diamine en donnant des phénazines. Or, l'adrénochrome ne donne avec l'O phénylène diamine qu'un produit amorphe, mal défini, qui n'indique nullement la formation d'une phénazine (HARLEY-MASON), donc l'existence de deux vrais groupements carbonyles O-quinone.

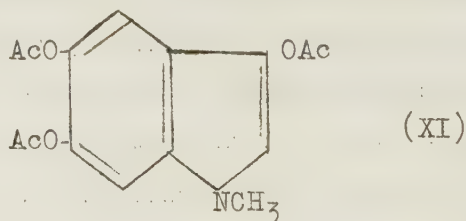
L'hydrogène mobile en α par rapport à l'atome d'azote est facilement substituable par un atome d'iode ou de brome (GREEN et RICHTER (3)).
RICHTER et BLASCHKO (29), par oxydation directe de l'adrénaline par l'iodate de potassium en milieu alcalin isolent le dérivé iodé : l'iodo-adrénochrome (VII) pour lequel ils proposent la formule suivante :



Comme dérivés de l'adrénochrome, on ne connaissait donc jusqu'ici que les dérivés du groupement carbonyle en C₅ et les dérivés de substitution halogénés du groupement méthylénique en C₂. En nous basant sur l'expérience de RAPER (6) qui, par méthylation de la "substance rouge" (VIII) obtenue par oxydation de la tyrosine par la tyrosinase, après décoloration de ce pigment par le vide ou le gaz sulfureux, avait isolé un di éther méthylique (X)^a, résultant de la transposition de la forme quinonique (VIII) en forme phénolique (X).



nous avons entrepris l'étude de l'estérification de l'adrénochrome. Par acétylation pyridinée, nous avons isolé le triacétoxy-3-5-6 N-méthylindole (XI) de P.F. = 113° - 114° qui cristallise en prismes incolores.



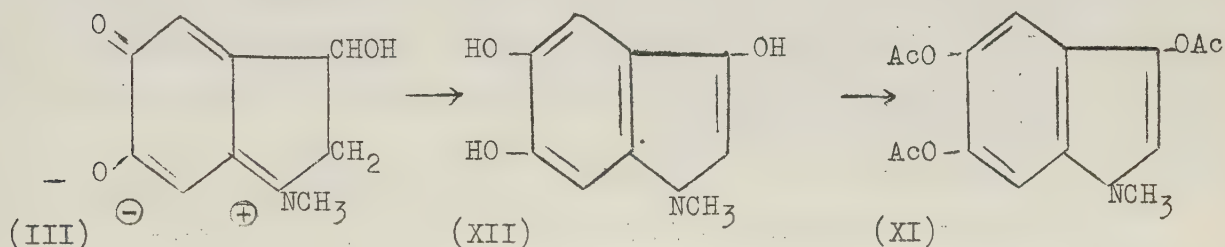
Analyse : C¹⁵H¹⁵O⁶N calculé : C = 59,23 H : 4,66 N : 4,68
Labor. Institut chimie (Bâle Suisse) 58,99 4,95 4,61
Labor microanalyse CNRS. (Paris) 58,78 5,11 4,38

Ce dérivé est identique avec le produit d'acétylation du tétrahydroxy-2-3-5-6

N-méthyl-dihydro-2-3 indole qui subit une déshydratation au cours de la réaction d'acétylation (HARLEY-MASON) (8) (*). (Ce produit ne donne pas de dépression de point de fusion.) Le triacétoxy-3-5-6 N-méthylindole (V) donne une réaction positive du noyau indole par le réactif d'EHRlich. Les tentatives d'hydrolyse faites jusqu'ici ne nous ont pas permis d'isoler le produit désacétylé d'une façon quantitative en raison de son instabilité.

Nous avons également essayé d'obtenir le dérivé benzoylé correspondant par benzylation pyridinée de l'adrénochrome ou par la méthode de SCHOTTEN-BAUMAN en solution aqueuse. Dans le premier cas, nous avons obtenu un produit huileux que nous n'avons pas réussi à cristalliser. Dans le second cas, l'action du chlorure de benzoyle en milieu alcalin donne lieu à la formation de produits insolubles amorphes.

L'obtention d'un tri-ester implique donc qu'il se fait, au cours de l'acétylation pyridinée un remaniement intra-moléculaire par passage de la forme quinone imine de l'adrénochrome (III) à une forme phénolique isomère (XII).

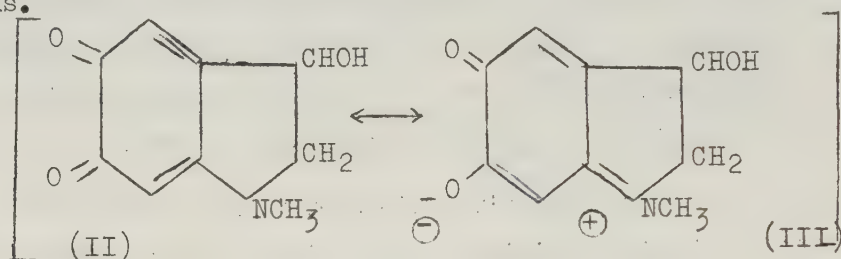


Nous reviendrons dans la suite de ce travail sur l'importance de cette forme phénolique (XII) isomère de l'adrénochrome.

(*)- Nous remercions M.J. HARLEY-MASON de nous avoir envoyé un échantillon de ce produit.

STRUCTURE ET TRANSPOSITIONS.

Deux structures sont admises pour l'adrénochrome, soit une structure o-quinonique (II) (GREEN et RICHTER (3)) soit une structure zwitterion p-quinone-imine (III) (HARLEY-MASON (8)). En fait, les deux formes sont mésomères : (II) diffère seulement de (III) par la position d'une paire d'électrons.



L'existence de cette structure dipolaire (III) a été proposée d'abord par HARLEY-MASON en se basant sur les faits suivants :

- Solubilités de l'adrénochrome : soluble dans l'eau, assez soluble dans l'alcool et presque insoluble dans le benzène et l'éther, qui sont l'indice d'une structure zwitterion.
- la réaction d'une seule molécule d'hydroxylamine ou de monosemicarbazide avec l'adrénochrome qui indique que la molécule ne contient probablement qu'un seul vrai groupement carbonyle.
- le mécanisme de la réduction de l'adrénochrome (cf. 2ème partie chap. I) qui ne peut s'interpréter d'une façon satisfaisante que sur la base de la structure (III).
- L'intense coloration de l'adrénochrome supérieure à celle d'une o-quinone ou d'un sel de quinone imine. Cette intensification de l'absorption lumineuse pourrait s'expliquer par une résonance hybride entre ces deux structures mésomères.

L'adrénochrome rouge, en milieu nettement acide, vire au jaune. Ce virage est réversible, à condition d'opérer un retour rapide à la neutralité, car cette forme jaune n'est pas stable et donne rapidement des pigments insolubles (mélanines). Ce virage a lieu entre $\text{pH} = 0,2$ et $\text{pH} = 2$, mais il faut tenir compte que, dans le cas des virages, le passage d'une forme à une autre est progressif, donc que cette transformation se fait sur une plus large échelle de pH que celle où le virage est visible. Dans ces conditions, l'adrénochrome libère l'iode de l'iodure de potassium. Le virage de l'adrénochrome s'accompagne donc d'une modification importante de ses propriétés oxydantes. Ces faits, déjà observés par BOUVET (10) doivent correspondre à une forme peroxydique de l'adrénochrome avec réorganisation des doubles liaisons du noyau, rendant cette forme instable et polymérisable.

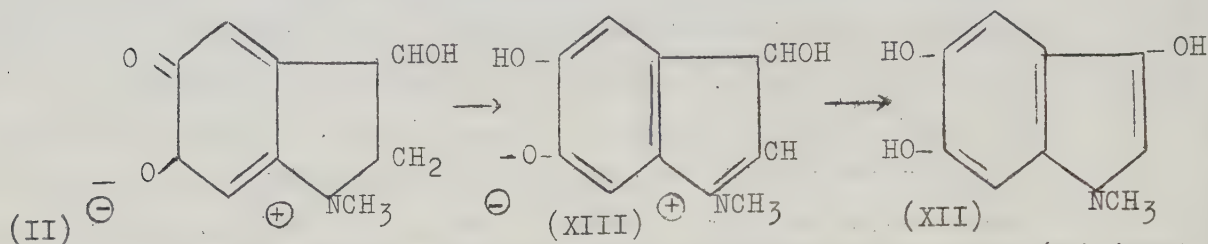
* * *

Nous avons vu que le pigment rouge indolique provenant de l'oxydation de la tyrosine subit, en solution aqueuse un remaniement intramoléculaire par transposition d'une forme quinonique (VIII) en une forme phénolique (X). Les preuves apportées par RAPER de cette transposition sont, d'une part, la décoloration du pigment rouge dans le vide, d'autre part, l'obtention d'un éther diméthylque de cette forme phénolique (X^a). Nous apportons des faits analogues pour l'adrénochrome.

1/- Le pigment rouge, en solution tampon à $\text{pH} = 6$, dans le vide se décolore et donne une réaction positive par le réactif d'EHRlich. Le chlorure ferrique en milieu légèrement acide, donne une coloration bleue violette fugace. La solution décolorée est très oxydable, et sa vitesse d'oxydation augmente rapidement avec le pH . Ces faits sont nettement en faveur de l'apparition de fonctions phénoliques.

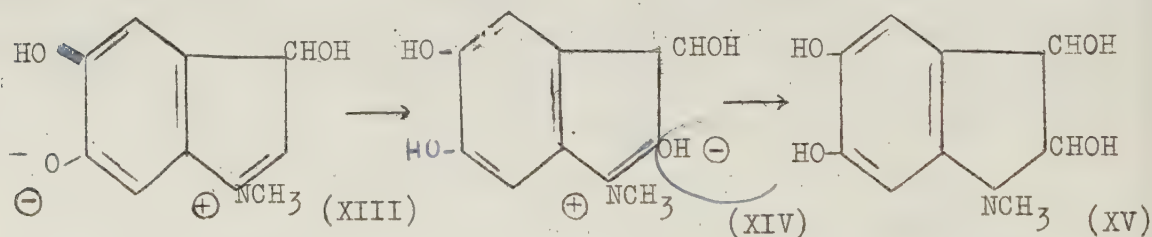
2/- Les solutions aqueuses d'adrénochrome au-dessus de $\text{pH} = 4$ contiennent un pigment fluorescent jaune vert extractible par l'éther. L'existence de ce pigment a déjà été signalé par GADDUM et SCHILD (32) UTEVSKY (33) WEST (34) et BEAUVILLAIN et SARRADIN (31). Mais nous n'avons pas réussi à l'isoler : par concentration de ses solutions sous vide, il se décompose.

3/- En solution pyridinée, par acétylation, nous avons isolé un ester (XI) (cf. p. 9) ce qui implique une transposition préalable de l'adrénochrome en trihydroxy-3-5-6 N-méthylindole (XII).



L'adrénochrome peut donc subir des remaniements intramoléculaires. Cette transposition de la forme quinonique (II) en forme phénolique (XII) doit se faire en deux étapes. D'abord, l'adrénochrome (II) se transforme par migration d'un proton en zwitterion à forme phénolique (XIII) qui, par migration d'un second proton se transforme en la forme limite (XII).

D'autre part, le zwitterion (XIII), en solution aqueuse peut passer par un stade hydrate intermédiaire (l'hydratation d'un ion dipolaire est une propriété générale) et se transposer en tétrahydroxy-2-3-5-6 N-méthyl-dihydro-2-3 indole (XV) qui, d'après HARLEY-MASON, se déshydraterait en (XII).



La vitesse de ces réactions de transposition dépend de nombreux facteurs, en particulier, nature et polarité du solvant, rH₂, pH et des réactions secondaires de polymérisation et peut-être d'oxydo-réduction intermoléculaires. L'action de ces variables apparaîtra nettement lors de l'étude de l'oxydation et de la polymérisation de l'adrénochrome (cf. 3e p. chap. I).

Une étude par des méthodes physiques permettant de saisir les molécules et leur transformation, sans les altérer, pourrait apporter de nouvelles preuves expérimentales de ces mécanismes. Mais déjà, les formules établies par des preuves chimiques et qui représentent les différents états possibles de l'adrénochrome permettent d'interpréter d'une façon précise les mécanismes de la réduction, de l'oxydation et de la polymérisation de l'adrénochrome.

PARTIE EXPERIMENTALE

PREPARATION DE L'ADRENOCHROME -

Oxydation chimique de l'adrénaline par l'oxyde d'argent.

L'adrénochrome a été préparé chimiquement par oxydation de l'adrénaline au moyen de l'oxyde d'argent. L'adrénaline base Rhône Poulenc : 1,83 gr (1/100 mol.) est dissoute dans 50 cm³ d'alcool méthylique sec acidifié par l'acide formique (2 cm³ pour 100 cm³ de CH₃OH) pour permettre la dissolution. La solution est maintenue à la température du laboratoire. L'oxyde d'argent fraîchement préparé, pulvérisé est ajouté à raison de 5,8 gr (2,5 mol.) d'un seul coup. On agite. La température s'élève vers 30°. L'agitation est poursuivie pendant 2 à 5 minutes (jusqu'à disparition des fonctions phénoliques caractérisées par la réaction au perchlorure de fer). La solution est filtrée sur Büchner. Ne pas laver pour éviter une dilution de la solution d'adrénochrome. Le filtrat est alors refroidi à - 20° le plus rapidement possible. L'adrénochrome cristallise. La solution est filtrée sous pression réduite. Les cristaux sont lavés par 2 cm³ de méthanol glacé. On les sèche immédiatement dans un dessiccateur à vide pendant une heure. Le rendement est de l'ordre de 25 pour 100. On obtient des cristaux rouges foncés, assez stables, qui doivent être conservés à l'abri de la lumière et surtout de l'humidité. Point de décomposition = 115°-120°. Cendres = traces C₉H₉O₃N - Calculé N = 7,79 / Trouvé (KJELDAHL) N = 7,19.

La recristallisation de l'adrénochrome dans le mélange alcool méthylique-acide formique donne de très mauvais rendements (15 p. 100). L'adrénochrome est légèrement soluble dans l'eau, de l'ordre de 1 pour 100. Les solutions aqueuses d'adrénochrome peuvent présenter des traces d'insoluble dues à la formation de mélanines par polymérisation de l'adrénochrome. Cette mélanisation est due à des traces d'humidité et se fait d'abord à la surface des cristaux. L'adrénochrome est soluble dans l'alcool éthylique, dans l'alcool

méthyllique, dans l'acétone, dans la pyridine, pratiquement insoluble dans les autres solvants organiques, en particulier dans l'éther de pétrole.

PREPARATION DE L'OXYDE D'ARGENT -

L'oxyde d'argent est préparé suivant la technique indiquée par HELFERICH et KLEIN (35). Le nitrate d'argent (50 gr) est dissous dans l'eau (500 cm³). La solution est chauffée à la température indiquée dans cette méthode (86°). L'oxyde d'argent est précipité par une solution aqueuse de soude à 10 p. 100 (un peu moins d'une molécule de NaOH pour une molécule de NO³Ag). On filtre sur Büchner. Le précipité est lavé avec de l'eau distillée chaude en particulier pour éliminer totalement la soude (4 litres en cinq fois). Puis le précipité d'oxyde d'argent est mis en suspension dans l'alcool absolu (175 cm³). On décante. Le précipité est recueilli sur un filtre en verre fritté, et de nouveau lavé à l'alcool. On sèche d'abord à l'air puis sur P₂O₅.

CHROMATOGRAPHIE -

L'adrénochrome contient en général de l'adrénaline comme impuretés (1 p. 100 à 1 p. 1000). Pour l'éliminer, les solutions aqueuses d'adrénochrome sont filtrées à l'abri de l'air sur permutite (2SiO₂, Al₂O₃, Na₂O, 6H₂O). Le poids de permutite utilisée est de quinze fois celui de l'adrénochrome en solution. La réaction est faite à pH = 7. La permutite est lavée par quelques cm³ d'acide acétique à 2 p. 100 pour neutraliser les traces d'alcali habituellement présentes. Ce lavage est suivi d'un rinçage à l'eau distillée. La solution passe sur la colonne à la vitesse d'une goutte par seconde.

EXTRACTION D'UN PRODUIT FLUORESCENT à partir de l'adrénochrome par l'éther humide

L'éther est agité avec l'eau, puis l'eau est décantée. L'éther est filtré deux fois sur papier pour enlever l'excès d'eau. L'extraction répétée de l'adrénochrome (1 gr) par l'éther humide le transforme en produit brun presque insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool avec une coloration brune, soluble dans l'acétone, peu soluble dans le benzène, insoluble dans

l'éther et l'éther de pétrole. Les extraits étherés présentent une fluorescence intense bleu-vert, les solutions étherées sont évaporées sous vide à la température ordinaire et donnent une coloration violette avec le réactif d'EHRLICH. Les traces d'eau sont éliminées par traitement par SO_4Na_2 anhydre. On obtient un résidu (50 mg), soit 5 p. 100, instable qui n'a pas pu être ni cristallisé ni acétylé en raison sans doute d'une trop grande oxydabilité.

PREPARATION DU TRIACETOXY-3-5-6 N-METHYLINDOLE - par acétylation pyridinée de l'adrénochrome.

L'adrénochrome (500 mg) est dissous dans la pyridine (30 cm³) où il laisse un léger insoluble dû à un début de mélanisation, que l'on élimine par filtration. On ajoute peu à peu l'anhydride acétique (2 cm³) en agitant, à la température du laboratoire. On laisse en contact dix-huit heures. La solution pyridinée qui a pris une coloration brun-verdâtre, est évaporée alors à sec sous vide à 40°. On obtient un résidu huileux brunâtre. Le résidu est repris par le benzène et séché sur sulfate de soude anhydre. Par évaporation sous vide, la solution benzénique laisse déposer une huile brunâtre partiellement cristallisée. Le résidu est dissous à nouveau dans un léger excès de benzène et additionné de quelques gouttes d'éther de pétrole (P.E. = 50° - 75°) jusqu'à louche non persistant. La solution laisse déposer des cristaux de triacétoxy-3-5-6 N-méthylindole (234 mg) soit un rendement partiel de 30 pour 100 du rendement théorique. P.F. = 108° - 111°. Par recristallisations successives, il forme des prismes incolores, brillants de P.F. = 113° - 114°. La substance est hygroscopique. P.M. théorique = 305.

Analyses : $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_6\text{N}$	Calculé :	C = 59,23	H = 4,66	N = 4,68
Laboratoire Inst. Chimie (Bâle)		58,99	4,95	4,61
Lab. microanalyse C.N.R.S.		58,78	5,11	4,38

Un point de fusion mélangé a été pris avec un échantillon du produit d'acétylation obtenu à partir du tétrahydroxy-2-3-5-6 N-méthylldihydro-2-3 indole par HARLEY-MASON et n'a manifesté aucune dépression. Le résidu qui n'avait pas pu être cristallisé est évaporé à sec et dissous dans un mélange de benzène (2 p.) et d'éther de pétrole (P.F. = 60° - 80°) (1 p.) Cette solution est chromatographiée sur alumine MERCK. (30 fois le poids de substance à chromatographier). On évapore à sec les différentes fractions. Les premières

ont pu être cristallisées dans le benzène éther de pétrole, en donnant le triacétoxy-3-5-6 N-méthylindole P.F. = 113-114°. La colonne d'alumine prend une teinte jaune verte à la surface en contact avec l'atmosphère, cette teinte vire au bleu en quinze minutes, puis au brun après une heure. Une décoloration préalable avant chromatographie, sur charbon (1 p. 100) du résidu dissous dans le benzène n'avait pas permis une nouvelle cristallisation. Ce composé est très peu soluble dans l'eau. Par ébullition en solution aqueuse, on obtient une coloration verte, fluorescente, due à un début d'hydrolyse vraisemblablement. Par addition de une goutte de solution de $\text{CO}_3\text{Na}_2\cdot 2\text{N}$, il donne une coloration verte, puis jaune, puis brune. Il est facilement soluble dans l'alcool, l'éther, l'acétone, le benzène, le tétrachlorure de carbone, le chloroforme, soluble également dans l'alcool méthylique en donnant une coloration verte. Par addition d'une goutte de solution aqueuse de CO_3HNa à 1 pour 100, une solution de triacétoxy-3-5-6 N-méthylindole dans un mélange d'eau (1 p.) et de dioxane (1 p.) donne rapidement une coloration verte qui se développe avec le temps puis une coloration brun rouge stable. Par addition de Na OH (3 molécules pour une molécule de produit) la solution se colore immédiatement en rouge brun puis apparition d'une fluorescence. Par neutralisation par ClH et réduction par l'hydrosulfite, il se forme un leuco dérivé jaune. Les cristaux de triacétoxy-3-5-6 N-méthylindole conservés à l'abri de la lumière et de l'humidité sont stables. Par exposition à l'air et à la lumière, ils prennent en atmosphère humide, à la longue, une teinte rouge saumon.

. Réactions du noyau indole - Le réactif d'EHRlich donne avec le triacétoxy-3-5-6 N-méthylindole une coloration rouge orange. (La réaction d'EHRlich est obtenue par addition de quelques gouttes de solution alcoolique de p. diméthylaminobenzaldéhyde à une solution alcoolique du produit (2 cm³). Avec une pipette on introduit au fond du tube 2 cm³ d'acide chlorhydrique à 20 p. 100). Dans ce cas, on obtient un anneau violet à l'interphase des deux couches. Par addition d'une trace de NO_2Na , on obtient une coloration rouge orangée.

Le nitroprussiate de sodium en milieu sodique donne une coloration bleue fugace qui vire au vert par addition d'acide acétique.

R E D U C T I O N

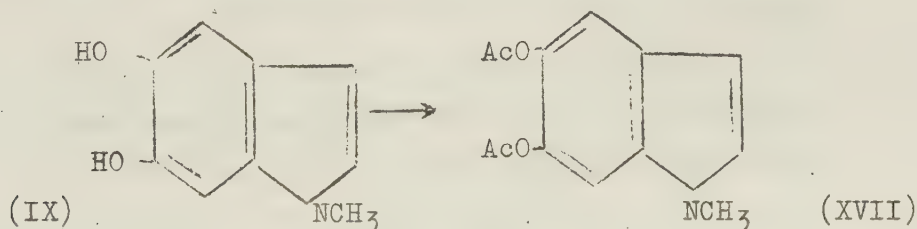
d e

L ' A D R E N O C H R O M E

MECANISME ET PRODUITS DE LA REDUCTION

GREEN et RICHTER (3) ont montré que l'adrénochrome peut agir, comme accepteur d'hydrogène réversible dans les "systèmes acide malique et acide lactique deshydrogénases". D'autre part, HARLEY-MASON (8), par réduction catalytique ou chimique de l'adrénochrome, obtient le dihydroxy-5-6 N-méthylindole (IX) par suite d'une déshydratation immédiate irréversible du leuco-adrénochrome (V). C'est cette contradiction qui nous a amené à reprendre l'étude de la réduction de l'adrénochrome.

Par réduction catalytique (H_2 -Pt) de l'adrénochrome en solution aqueuse, à la température du laboratoire et à la pression atmosphérique, nous avons obtenu la fixation d'un seul atome d'hydrogène par molécule d'adrénochrome. Par extraction à l'éther, nous avons isolé le dihydroxy-5-6 N-méthylindole (IX), cristaux incolores P.F. = $135^\circ - 136^\circ$ qui a été identifié également après acétylation pyridinée sous forme de son diacétate (XVII) déjà décrit en 1942 par BERGEL et MORRISON (36). Le dérivé diacétyle cristallise dans l'acétone, éther de pétrole en prismes incolores brillants de P.F. = $112^\circ - 113,5^\circ$.



Le second produit n'a pas pu être isolé : ses solutions se décomposent par concentration et par contact à l'air. La solution primitivement jaune se colore en rouge orange. Mais du fait que le dihydroxy-5-6 N-méthylindole (IX) exige deux atomes d'hydrogène pour se former à partir de l'adrénochrome et que l'absorption d'hydrogène s'arrête quand seulement un atome d'hydrogène par molécule d'adrénochrome a été fixé, le produit restant en solution dans

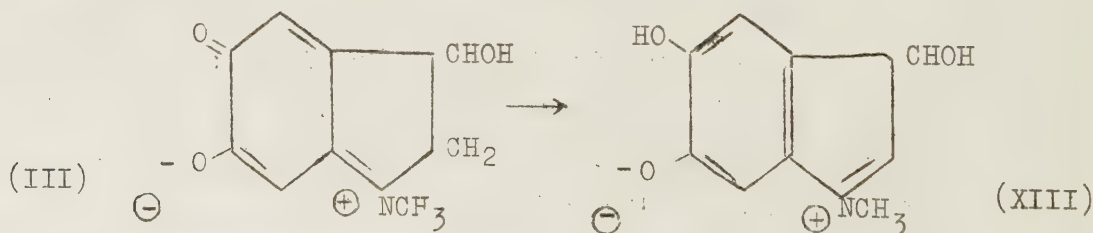
les eaux mères est donc un isomère de l'adrénochrome, non réductible par H_2 - Pt.

Par contre, la réduction par l'hydrosulfite de sodium nous a donné des rendements variables en dihydroxy-5-6 N-méthylindole (IX) suivant les conditions de la réaction. Une solution aqueuse d'adrénochrome à 1 p. 50, à la température de 0° , réduit par une solution fraîchement préparée d'hydrosulfite de sodium ($pH = 7$) également maintenue à 0° , donne un rendement en dihydroxy-5-6 N-méthylindole (IX) extractible à l'éther, voisin de 100 p.100 (92 p. 100) ce qui correspond à la fixation de 2 atomes d'hydrogène par molécule d'adrénochrome, alors que HARLEY-MASON (8) a obtenu des rendements correspondant seulement à la fixation d'un atome d'hydrogène. En raison de l'instabilité du dihydroxy-5-6 N-méthylindole (P.F. = $135^\circ - 136^\circ$) nous avons immédiatement bloqué les fonctions phénol par acétylation pyridinée, et nous avons obtenu le diacétoxy-5-6 N-méthylindole (XVII) P.F. = $113^\circ - 114^\circ$ avec un rendement supérieur à 65 p. 100. Le mélange des produits acétylés obtenus par réduction chimique et réduction catalytique ne donne lieu à aucune dépression de point de fusion. En opérant en milieu alcalin, nous avons obtenu de mauvais rendements inférieurs à 50 p. 100 en raison de l'instabilité de l'adrénochrome en présence de soude.

* * *

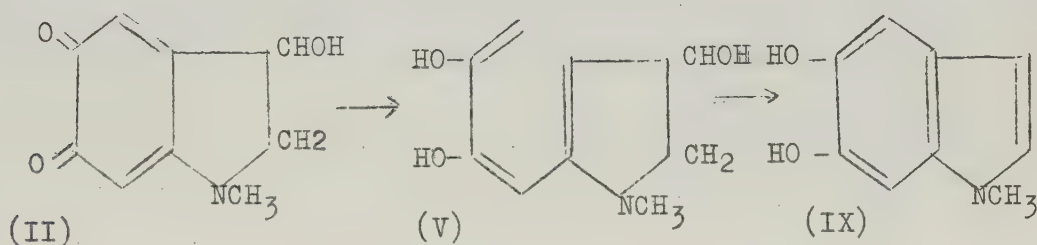
Les résultats de nos expériences nous amènent à la théorie suivante de la réduction de l'adrénochrome. Celle-ci présente trois degrés différents suivant la puissance du milieu réducteur.

1 - En milieu très faiblement réducteur, l'adrénochrome subit lentement une oxydo-réduction intramoléculaire par transposition de la forme quinone imine (III) en forme phénolique (XIII).

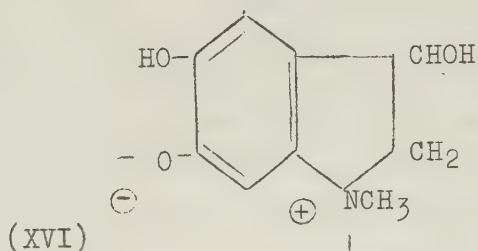


2 - Par réduction catalytique ($H^2 + Pt$, $H^2 + Pd$ charbon) la même réaction de transposition est favorisée par le milieu réducteur, mais, dans

ce cas, l'adrénochrome sous forme p-quinone-imine (III) est réduit. L'importance de ces deux réactions est fonction de leurs vitesses. La formation en quantités approximativement égales du dihydroxy-5-6 N-méthylindole (IX) et d'un isomère de l'adrénochrome non réductible et la faible vitesse de transposition dans les conditions où nous avons pu l'observer (atmosphère d'hydrogène) nous fait accepter l'opinion de HARLEY-MASON. Il se fait une réduction de l'adrénochrome par addition d'un atome d'hydrogène et formation d'une semi-quinone (XVI)



Cette semi-quinone (XVI) se dismute en dihydroxy-5-6 N-méthylindole (IX) par deshydratation du leucoadrénochrome (V) et en la forme phénolique (XIII) isomère de l'adrénochrome.



En milieu très réducteur ($S_2O_4Na_2$), il se fait une réduction immédiate de l'adrénochrome par fixation d'un atome d'hydrogène et formation de la semi-quinone (XVI), mais dans une seconde phase, la semi-quinone fixe un second atome d'hydrogène avec formation du leuco-adrenochrome (V) qui se deshydrate immédiatement en dihydroxy-5-6 N-méthylindole (IX).

SYSTEME D'OXYDO-REDUCTION

A la suite des travaux de GREEN et RICHTER (3) et de GREEN et BROSTEAUX (38), WIESNER (37) a tenté de mettre en évidence la réversibilité du système adrénochrome - leuco-dérivé, par la méthode polarographique ; l'existence d'un palier sur les courbes au cours de la réduction, l'amène à conclure à la réversibilité du système. Il trouve comme valeur de $E^{\circ} = + 0,044$ v. à pH = 7 et à 20° (l'adrénochrome est réduit par l'hydrosulfite de sodium). La forme réduite du système redox s'est montrée très instable, particulièrement aux températures supérieures à 0° et en milieu acide. Par augmentation de la concentration des solutions, la valeur du potentiel E° se déplace vers les valeurs négatives. WIESNER a essayé d'expliquer ce déplacement par la dimérisation de la forme oxydée du système. L'existence de plusieurs formes isomères dans les solutions d'adrénochrome et la difficulté d'interprétation des résultats obtenus par polarographie obligent à faire des réserves sur ces conclusions.

HARLEY-MASON, se basant sur les résultats de la réduction chimique et catalytique de l'adrénochrome, conclut que l'adrénochrome et le leuco-adrénochrome ne peuvent pas former un système redox du fait que ce dernier subit immédiatement une deshydratation irréversible. D'après cet auteur, l'interprétation la plus probable est la formation d'un système redox par transfert d'un électron entre l'adrénochrome et la semi-quinone qui en dérive par fixation d'un seul atome d'hydrogène. Un mécanisme identique par transfert d'un électron a été proposé pour d'autres systèmes de transporteurs par WATERS (40) auquel se réfère d'ailleurs HARLEY-MASON.

* * *

Nous avons repris cette question de l'oxydo-réduction d'abord par la méthode chimique. La réduction chimique et catalytique de l'adrénochrome, dans les conditions où nous l'avons étudiée, est strictement irréversible :

le leuco-adrénochrome se deshydratant immédiatement en dihydroxy-5-6 N-méthyl indole. Mais, l'action des réactifs chimiques pouvant être responsable de la deshydratation du leuco-adrénochrome, nous avons essayé d'obtenir la réversibilité en utilisant des réducteurs biologiques : acide ascorbique, cystéine, codeshydrogénase I (réduit par l'hydrosulfite de sodium) en quantité semi et équimoléculaires par rapport à l'adrénochrome (1.10^{-4}). Des expériences ont été faites dans un premier stade, sous vide, en tube de THUNBERG, pour réduire l'adrénochrome en leuco-dérivé. Nous avons constaté la décoloration de l'adrénochrome, mais dans le deuxième stade où l'oxygène atmosphérique est introduit, nous n'avons jamais pu obtenir la recoloration du leuco-dérivé.

L'échec de ces tentatives nous a amené à faire un examen critique des expériences de GREEN et RICHTER. Nous avons constaté que, telle qu'elles sont exposées dans leur mémoire (page 607), elles n'apportent pas la preuve de la réversibilité de la réaction :

"In the complete adrenaline malic or lactic system, the end of the lag period and the commencement of rapid oxygen uptake was characterised by the appearance of a red colour in the solution. This red colour disappeared if the shaking was discontinued but reappeared on shaking with air and persisted as long as the solution was kept well oxygenated." (p. 607).

"When once the adrenochrome had been formed ..., Adrenochrome was reduced by the malic system to leuco-adrenochrome which, in turn, reoxidised, so that the adrenochrome acted as an oxygen carrier". (p. 613). Dans ces conditions expérimentales, nous avons constaté que l'apparente réversibilité de la réaction est due à la présence dans le système de molécules d'adrénaline non encore transformées qui subissent une oxydation directe en adrénochrome rouge par suite de l'agitation qui augmente la vitesse de diffusion de l'oxygène dans la solution, et non à une réoxydation du leuco-dérivé. La réversibilité par un examen colorimétrique d'une réaction d'oxydo-réduction, ne peut être prouvée qu'en partant du composé lui-même et non d'un de ses précurseurs qui, par oxydation, donne directement la forme oxydée colorée du système.

GREEN et RICHTER (3) ont signalé également que l'acide ascorbique et

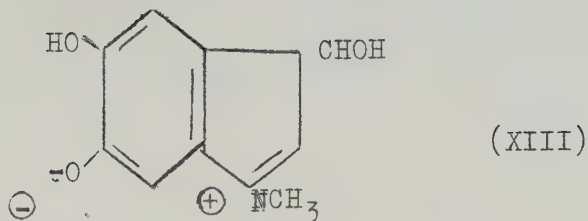
le glutathion n'avaient pas d'action inhibitrice sur le système indiqué ci-dessus lorsque l'adrénaline est remplacée par l'adrénochrome. Or celui-ci en présence d'acide ascorbique ou de glutathion, subit une décoloration irréversible. Avec la cystéine, présentant un potentiel d'oxydo-réduction du même ordre que le glutathion, on observe, en milieu neutre, la précipitation de cystine qui indique que l'adrénochrome subit une réduction. Par contre, dans le cas de l'acide ascorbique, comme l'ont déjà constaté VERLY (21) et BEAUVILLAIN et SARRADIN. (31), l'adrénochrome n'est pas réduit.

D'autre part, GREEN (39) et GREEN et RICHTER (3) introduisent dans le système un fixateur de cétone : cyanure, semi-carbazide, hydroxylamine, hydrazine, pour bloquer l'acide cétonique formé par oxydation de l'acide lactique afin que la réaction se poursuive. Or, ces mêmes produits peuvent réagir également avec un groupement carbonyle de l'adrénochrome sous forme quinonique. GREEN et RICHTER (3) avaient observé une décoloration de l'adrénochrome par le bisulfite de sodium et attribuaient ce phénomène à la formation de leuco-adrénochrome (V) se basant, en particulier, sur le maintien du pouvoir rotatoire qui implique la présence d'un carbone asymétrique donc de -CHOH. En fait, l'adrénochrome n'est pas réductible par l'anhydride sulfureux. BOUVET (10) a montré, par une méthode analytique qu'il se forme une combinaison bisulfitique.

* * *

Comme pour d'autres transporteurs, on doit encore s'en tenir à des hypothèses sur la nature du système d'oxydo-réduction. Cependant, l'impossibilité de mettre en évidence expérimentalement la réoxydation en forme quinonique des produits de réduction de l'adrénochrome, la critique de l'expérience de GREEN et RICHTER, à ce sujet, et les particularités de la réduction chimique et catalytique de l'adrénochrome nous amènent à poser l'hypothèse de travail suivante : l'ion polaire (XIII) qui se forme par transposition de l'adrénochrome et non la quinone rouge constituerait la forme oxydée du système redox intervenant, en particulier, dans la deshydrogénation enzymatique de l'acide lactique.

Ce zwitterion (XIII) possède une structure semblable à celle conférant



leur activité de transporteurs d'hydrogène à d'autres molécules azotées importantes dans les systèmes biologiques (aneurine, amide nicotinique).

De plus, l'obtention de deux degrés différents de réduction pour l'adrénochrome suivant la nature des réducteurs : un atome d'hydrogène par H_2 -Pt d'une part, de deux atomes d'hydrogène par l'hydrosulfite de sodium de l'autre, présente également un parallélisme concordant avec l'aneurine et l'amide nicotinique engagés dans les coenzymes. Ces molécules, en effet, subissent la même particularité de réduction par ces agents réducteurs. (R.R. WILLIAMS (41)).

La forme phénolique de structure polaire (XIII) permet donc de poser l'hypothèse de travail d'un système d'oxydo-réduction par fixation d'hydrogène sur la double liaison la plus proche de l'atome d'azote, le rôle de zwitterion (XIII) isomère de l'adrénochrome comme transporteur, pourrait appartenir, non seulement à la molécule libre, mais également à la molécule associée à d'autres groupements, en particulier phosphorylés et, ainsi intervenir, comme coenzyme dans les déshydrogénations et également les transphosphorylations.

PARTIE EXPERIMENTALE

REDUCTION DE L'ADRENOCHROME PAR L'HYDROSULFITE DE SODIUM et préparation du dihydroxy-5-6 N-méthylindole -

Une solution aqueuse d'adrénochrome (200 mg dans 10 cm³ d'eau) est maintenue à 0° dans un bain de glace. Par ailleurs, on prépare une solution d'hydrosulfite de sodium (400 mg) dans 4 cm³ d'eau que l'on maintient également à 0° pour éviter la décomposition préalable de l'hydrosulfite suivant $S_2O_4^{--} + 2H_2O \rightarrow 2HSO_3^- + H_2$ la solution d'hydrosulfite est versée d'un seul coup dans la solution d'adrénochrome. le ballon est bouché et le mélange est agité pendant quelques minutes puis conservé à 0° pendant 15 minutes. La solution prend immédiatement une teinte jaune verdâtre. On extrait plusieurs fois à l'éther (6 fois 50 cm³). Les opérations suivantes sont faites sous azote. Les extraits étherés sont lavés trois fois par de l'eau saturée de ClNa, puis séchés sur sulfate de sodium anhydre et évaporés sous vide à sec. Le résidu est repris une fois par 2 cm³ de benzène pour chasser éventuellement les traces d'humidité et cristallise en partie. Le poids du résidu est de 140 mg. Il est alors repris par un mélange de 15 cm³ d'éther et 25 cm³ d'éther de pétrole (P.E. 50° - 75°) et à nouveau concentré jusqu'à ce qu'un léger précipité rougeâtre se forme. On filtre. La liqueur est alors évaporée jusqu'à début de cristallisation que l'on amorce par un cristal. Le résidu laisse déposer le dihydroxy-5-6 N-méthylindole P.F. = 135° - 136°. Le produit forme des prismes incolores brillants.

Le dihydroxy-5-6 N-méthylindole est soluble dans l'alcool, l'acétone, l'éther, légèrement soluble dans le benzène et l'eau, insoluble dans l'éther de pétrole. Les solutions étherées présentent une nette fluorescence vert-jaune.

Réaction du noyau indole : le réactif d'EHRlich donne avec le dihydroxy-5-6 N-méthylindole une coloration violette à la température du laboratoire

la réaction au nitroprussiate en milieu sodique donne une coloration bleue violette et par passage en milieu acétique, une coloration bleue-noire.

Réaction du groupement O-diphénol : le réactif au chlorure ferrique donne une coloration verte dans l'alcool.

Des essais de cristallisation à l'air montrent que le produit s'altère rapidement dans ces conditions avec apparition d'une coloration brun jaune. Par exposition à l'air, les cristaux rougissent rapidement. Le sulfate de sodium qui a servi à déshydrater les solutions étherées fixe des traces de dihydroxy-5-6 N-méthylindole. Une coloration bleue apparaît dans le délai de une heure ou deux heures à la surface des cristaux de sulfate de sodium. Ce pigment bleu est insoluble dans l'eau et les solvants organiques, très légèrement soluble dans la pyridine.

L'addition de bicarbonate de sodium à une solution aqueuse entraîne une oxydation rapide. Il se forme immédiatement une coloration noire ou un précipité de mélanines. Ce précipité traité par l'hydrosulfite de sodium donne un leuco dérivé jaune.

La réduction de solutions aqueuses d'adrénochrome par addition d'hydrosulfite de sodium goutte à goutte, donne une solution brun-jaune avec formation d'un précipité, vraisemblablement de soufre (Rend. = 5 p. 100).

Rendement de la réduction de l'adrénochrome par l'hydrosulfite de sodium en milieu neutre (en produit brut).

Rendement théorique : 100 mg. d'adrénochrome donnent 90 mg. de dihydroxy-5-6 N-méthylindole.

Résultats des expériences

Adrénochrome :		Produits extractibles à l'éther :
1 exp.	300 mg	234
2e "	200	134
3e "	200	169
4e "	200	140
5e "	60	44
6e "	1800	1565
	2760	2286

Rendement obtenu en produit extractible (83 mg p.100 mg Ad°)= 92p.100

PREPARATION DU DIACETOXY-5-6 N-METHYLINDOLE -

Le résidu laissé par évaporation à sec des extraits étherés provenant de la réduction de l'adrénochrome est repris par la pyridine (1 cm³ pour 10 mg de résidu) et de l'anhydride acétique (0,5 cm³). L'acétylation pyridinée était maintenue dix-huit heures à la température du laboratoire. L'évaporation à sec sous vide laisse un résidu huileux jaunâtre. On reprend une fois par 2 cm³ de xylène ou de benzène et on évapore à nouveau à sec. Le résidu est dissous dans l'éther, lavé par ClH 2N une fois, par l'eau deux fois, puis par CO₃HNa 2N une fois et par l'eau ensuite jusqu'à neutralité au papier de tournesol. La solution étherée est séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée sous vide à sec. Au contact du vide entraînant un refroidissement, la solution cristallise partiellement P.F. = 102°-107° en prismes colorés en jaune. Recristallisé dans un mélange éther, éther de pétrole, on obtient des prismes incolores, brillants, de P.F. = 112°-113°5). Rendement en produit cristallisé : 65 p. 100. En produit brut, de l'ordre de 100 p. 100. P.M. théorique = 247.

	C	H	N
Analyses : C ₁₃ H ₁₃ O ₄ N calculé	63,13	5,29	5,69
Labo. microanalyse C.N.R.S.	63,22	5,29	5,70
KAHANE (Paris)	63,08	5,18	5,81
	62,83	4,62	5,69

Les eaux mères qui ne peuvent pas être cristallisées sont chromatographiées par Al₂O₃ MERCK (30 fois le poids de substance à chromatographier). La plus grande partie du produit est éluée par le benzène.

Le diacétoxy-5-6 N-méthylindole donne une réaction positive avec le réactif d'EHRLICH. Avec le réactif au nitroprussiate de sodium, en milieu sodique, on obtient une coloration bleue violette et par passage en milieu acétique une coloration bleue noire.

L'addition d'une goutte de solution de CO₃K₂ entraîne une oxydation rapide. La solution devient verte, puis bleue, puis noirâtre. Il ne se forme pas de précipité.

REDUCTION CATALYTIQUE DE L'ADRENOCHROME -

L'adrénochrome (500 mg) est dissous dans 50 cm³ d'eau distillée. Le noir de Platine Vavon (300 mg) : est mis en suspension dans de l'eau distillée et agitée avec de l'hydrogène jusqu'à ce que l'absorption cesse. Un excès de noir de Platine a été employé pour être sûr que la limite d'hydrogénation soit atteinte rapidement. La réduction est faite à la température du laboratoire et à la pression atmosphérique. La vitesse d'agitation de l'appareil est de 100 oscillations par minute. La solution d'adrénochrome est ajoutée et agitée avec de l'hydrogène sec et privé de traces d'oxygène par passage sur du cuivre chauffé à 500° (ou on agite avec du pyrogallate de potassium), l'agitation est poursuivie jusqu'à cessation d'absorption. La durée d'hydrogénation a été de 30 minutes. La quantité d'hydrogène fixé a été de 33 cm³. Le volume d'unemol.H² correspondant à une molécule d'adrénochrome pour 500 mg de produit est de 60 cm³. L'absorption d'hydrogène a donc été de un atome par molécule d'adrénochrome. La solution au cours de l'hydrogénation prend rapidement une coloration vert-brune, qui devient jaunâtre par la suite. On extrait plusieurs fois à l'éther -(6 fois par 50 cm³). Par contact à l'air, la solution jaune devient orangée puis rouge orangée lors de l'agitation avec l'éther. Les extraits étherés sont alors réunis et traités d'une façon identique à celle qui a été décrite lors de la réduction de l'adrénochrome par l'hydrosulfite de sodium, puis acétylés.

La quantité de produit brut extrait par éther avant acétylation a été de 200 mg pour 500 mg d'adrénochrome. Un rendement de 100 p. 100 représenterait 450 mg de dihydroxy-5-6 N-méthylindole pour 500 mg d'adrénochrome, ce qui donne comme rendement 44 %. Ce rendement correspond approximativement à celui donné par l'absorption de un atome d'hydrogène par molécule d'adrénochrome.

Le produit recristallisé a un point de fusion P.F. = 110-111°. Il ne donne lieu à aucune dépression par mélange avec le diacétoxy-5-6 N-méthylindole obtenu par réduction par hydrosulfite suivi d'acétylation.

Les eaux-mères ne sont pas extractibles par aucun solvant. Le traitement par la soude diluée (NaOH N) fait apparaître une fluorescence verte.

OXYDATION ET POLYMERISATION

DE L'ADRENOCHROME

MECANISME DE L'OXYDATION ET DE LA MELANISATION (*)

L'oxydation de l'adrénaline, en solution aqueuse, donne l'adrénochrome par fixation de deux atomes d'oxygène - RAPER (7) (42) en abordant l'oxydation de l'adrénaline au cours de son étude de la "Tyrosinase - Tyrosine réaction", a envisagé le problème des transformations du pigment rouge qui se formait et qui était, en fait, l'adrénochrome - Dès 1930, il constate que ce pigment n'est pas entièrement converti en mélanines au cours de son oxydation en présence de tyrosinase et conclut que la marche de l'oxydation de l'adrénaline doit être plus complexe que celle de la tyrosine (7). En 1933, il note la formation de mélanines en atmosphère d'hydrogène à partir des solutions de "substance rouge" obtenue par oxydation de l'adrénaline par la tyrosinase et une forte réaction positive de l'indole par la solution surnageante (42). Ce sont ces faits expérimentaux qui ont servi de point de départ à notre étude. En effet, la littérature postérieure à ce travail est confuse : les mélanines sont en général, considérées comme les termes ultimes de l'oxydation (4) (5) (18) sauf par POLONOVSKI (16) qui envisage une déshydratation de l'adrénochrome, par analogie avec le schéma de RAPER (7, 21, 44) concernant la formation de mélanines à partir de la tyrosine.

L'existence de corps hypothétiques a été proposée. G. COHEN (48) (49) se basant sur des réactions colorées des cétones, qu'il effectue en milieu complexe, considère que l'adrénochrome se transforme, par oxydation de sa fonction alcool secondaire en fonction cétone, en "oxoadrénochrome", qui, par condensation, conduirait aux mélanines pour lesquelles il propose une structure polyindirubinique. BEAUVILLAIN et SARRADIN (3) dans une étude spectrographique, envisagent la formation de mélanines plus ou moins oxydées à partir de l'oxoadrénochrome ou de leuco-oxo-adrénochrome. DEROUAUX (17) signale une "substance jaune" au delà du stade mélanines. D'autre part, des physiologistes ont caractérisé par des actions pharmacologiques irrégulièrement retrouvées d'ailleurs des termes intermédiaires : "adrénoxine" par BACQ et

(*) P. AUGEREAU & C. FAUCHER: Note préliminaire: Produits d'oxydation de l'adrénochrome. - Bull. Soc. Chim. 1950, 17, 683.

HEIRMAN (4), "chromadrénine A" par MINZ et PLOTKA (5).

* * *

Dans ce travail, nous avons d'abord mis en évidence les phénomènes suivants : les solutions aqueuses d'adrénochrome, à la concentration de 1 pour 1000, dans le vide subissent une transformation totale en pigments insolubles aux pH inférieurs à 2 - La méthode utilisée a été la technique de THUNBERG. Par contre, aux pH supérieurs à 6, à la même concentration, la transformation en mélanines est nulle ; la solution rouge prend une coloration jaune avec une fluorescence verte qui croît avec l'élévation du pH. Aux pH compris entre 2 et 6, on a une phase insoluble dont la quantité s'abaisse avec l'élévation du pH et une phase soluble jaune dont la quantité varie en sens inverse. Les solutions colorées surnageant donnent une réaction positive du noyau indole et une coloration bleue violet fugace avec le chlorure ferrique. Au contact de l'oxygène de l'atmosphère, on observe des transformations analogues, avec cette seule différence que la phase soluble prend une coloration brun jaune due à une oxydation à l'air, que nous avons contrôlée à l'appareil de WARBURG.

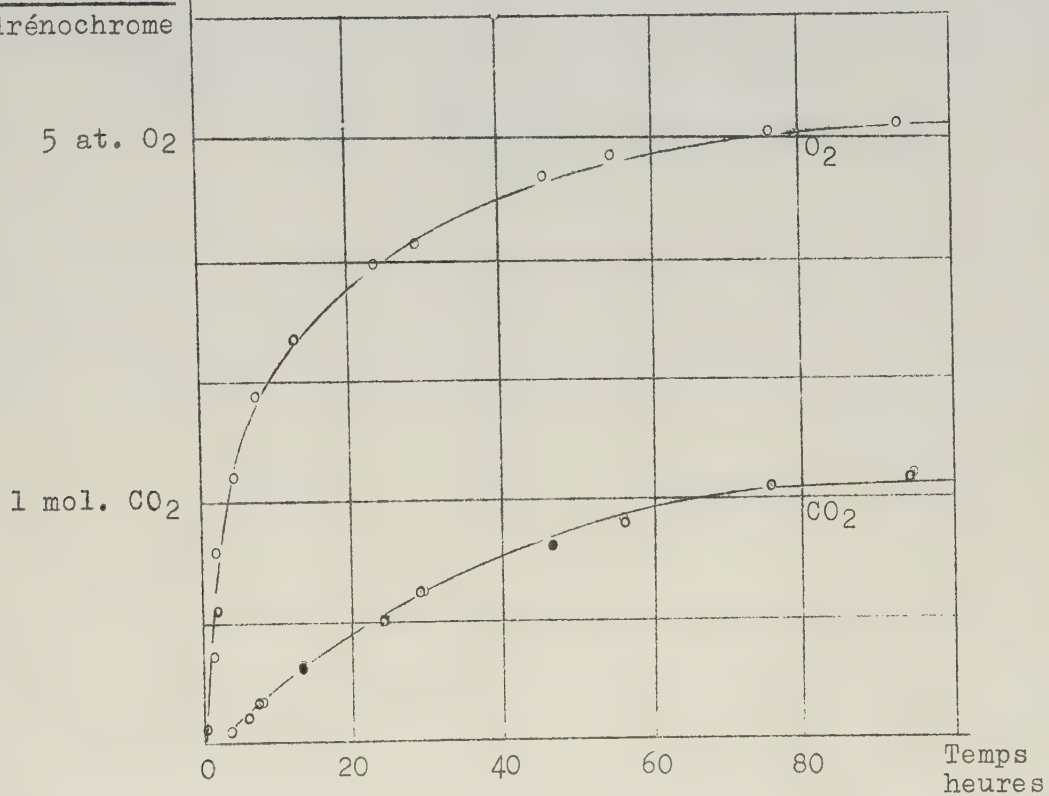
L'étude quantitative de l'oxydation de l'adrénochrome était nécessaire pour avancer dans l'interprétation de ces phénomènes. La technique que nous avons utilisée a été la méthode manométrique de WARBURG. Nous avons trouvé que l'oxydation de l'adrénochrome à une concentration de l'ordre de 1 pour 1000, en solution tampon, par l'oxygène de l'air, à 37°, présente des variations très importantes suivant le pH. Aux pH inférieurs à 2, l'absorption d'oxygène s'arrête quand seulement un demi atome d'oxygène par molécule d'adrénochrome a été absorbé et il n'y a aucun dégagement de gaz carbonique. Aux pH supérieurs à 6, cette oxydation fixe 6 atomes d'oxygène approximativement et s'accompagne du dégagement d'une molécule de gaz carbonique par molécule d'adrénochrome. Aux pH compris entre 2 et 6, la consommation d'oxygène croît avec le pH ainsi que le dégagement de gaz carbonique. La consommation d'oxygène, dans ce dernier cas, relève, d'une part, de l'oxydation de la phase insoluble, que nous avons contrôlée à l'appareil de

DEGRADATION OXYDATIVE
de

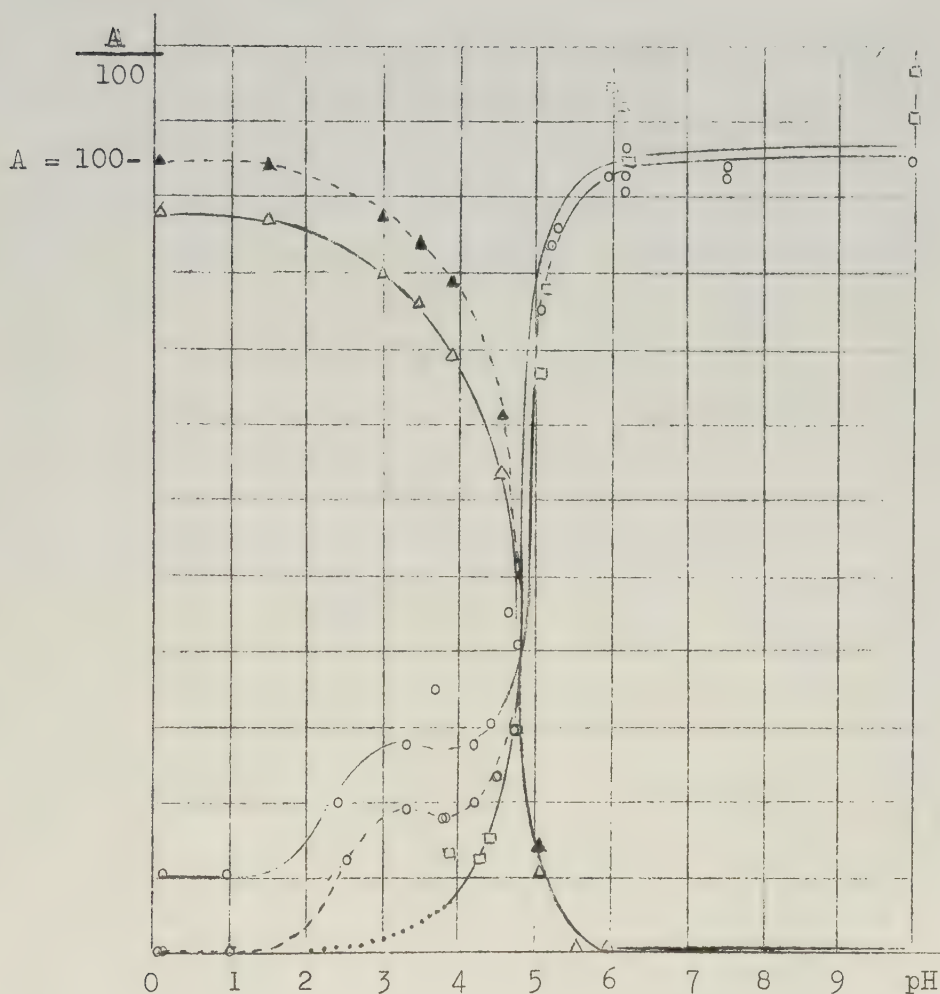
1 ' ADRENOCHROME

Solution à 1/1000 - pH = 5,9 - T = 37°

At. O₂ ou Mol. CO₂
mol. Adrénochrome



FORMATION DE MELANINES
e t
DEGRADATION OXYDATIVE DE L'ADRENOCHROME
EN FONCTION DU pH.



- ▲▲▲ $A/100$ mélanines exprimées en quinone-5-6 N-méthylindole: val.expert.
- ▲-▲- " mélanines exprimées en adrénochrome (= + 1 H₂O)
- ○ ○ " oxygène fixé/mol. adrénochrome valeurs expérimentales.
- ● ● " produit oxydé (5,5 at.O₂/mol. adrénochrome) i.e.pourcentage d'O₂ total, moins pourcentage oxygène fixé par les mélanines. 1/2 at.O₂)
- □ □ " CO₂ dégagé (une mol. de CO₂/mol. adrénochrome); val.expérimentale.

Note: 2 < pH < 4: fixation d'oxygène supérieure à la quantité théorique: réaction secondaire(?).

WARBURG, d'autre part, de l'oxydation de la phase soluble s'accompagnant de décarboxylation - les quantités d'oxygène fixées et de gaz carbonique dégagées, ainsi que les quantités de mélanines formées varient en sens inverse. Donc, l'oxydation augmente avec le pH alors que la mélanisation diminue et inversement (cf. courbe).

Aucune étude manométrique de l'oxydation de l'adrénochrome n'avait été faite jusqu'ici. Notons cependant que dans une étude polarographique, I. EHRLÉN (30) a signalé l'oxydation du composé fluorescent qui se forme dans les solutions aqueuses d'adrénochrome. Les seuls travaux auxquels on puisse se référer concernant l'oxydation catalytique ou enzymatique par les phénoloxydases de l'adrénaline sont ceux de DULIERE et RAPER (7), mais cette oxydation n'a été étudiée manométriquement qu'entre pH = 7 et pH = 8. Comme limite d'oxydation, DULIERE et RAPER (7) ont obtenu 5,30 atomes à pH = 8 en milieu tampon en présence de tyrosinase, et 6,14 atomes en l'absence d'enzymes. BLASCHKO et SCHLOSSMANN (45) ont obtenu 5 à 6 atomes par la catéchol oxydase. Récemment, CHAIX, CHAUVET et JEZEQUEL (9) dans une étude cinétique de l'oxydation de l'adrénaline, ont trouvé que la dégradation oxydative totale, en tampon phosphate (pH = 7,6), catalysée par des ions métalliques fixait de 6 à 8 atomes d'oxygène par molécule d'adrénaline. Quant à la décarboxylation, seul WELCH (46), en 1934, a signalé la formation de CO_2 , dans une étude manométrique de la catalyse de l'oxydation de l'adrénaline par les amino acides (46). Les limites d'oxydation qu'il obtient à pH = 7,3 sont de 8 à 9 atomes d'oxygène par molécule d'adrénaline. WELCH émet cependant l'hypothèse de la formation d'un complexe de polymérisation indolique avec oxydation en chaîne, sans tenir compte de la décarboxylation, mais nous étions intéressé de retrouver une concordance avec nos résultats.

Nous avons également fait varier certaines conditions de la réaction pour voir leur influence sur les limites respectives de l'oxydation et de la polymérisation.

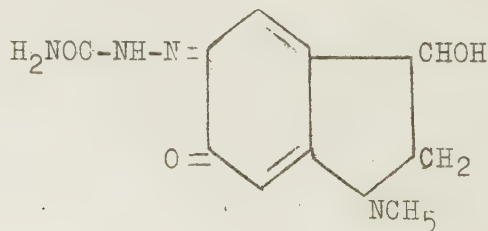
L'élévation de température, en augmentant la vitesse de la réaction d'oxydation et sans doute de transposition déplace l'équilibre des réactions vers l'oxydation dans la zone de température où les expériences ont été faites soit : $10^\circ - 20^\circ - 37^\circ$ - (cf. tableaux p. 50-51).

L'augmentation de la concentration en adrénochrome déplace le sens des réactions au profit de la mélanisation. Les solutions à 1 p. 10.000 ne donnent pas de mélanines au-dessus de $\text{pH} = 2$, alors que celles à 1 p. 100 en donnent jusqu'à $\text{pH} = 10$, à la température du laboratoire. A la limite, l'adrénochrome en cristaux mélanise presque instantanément en atmosphère saturée de vapeur d'eau, sans aucune consommation d'oxygène (cf. Tableaux p.

L'ionisation joue un rôle primordial dans les réactions qui s'effectuent dans l'eau, milieu doué de polarité. C'est pourquoi nous avons étudié la variation de ce facteur. CHAIX, CHAUVET et JEZEQUEL (9) (47) ont montré que l'addition de sels neutres (ClK , ClNa) et d'ions phosphate accélère l'oxydation de l'adrénaline. Nous avons mesuré la consommation d'oxygène par une solution d'adrénochrome, dans de l'eau bidistillée uniquement dans un appareil en pyrex, sans addition de sels. Cette consommation, après 24 heures est seulement de un atome d'oxygène, et la formation de pigments est très importante. Par contre, à $\text{pH} = 5$, en milieu tampon phosphate ou acétate de sodium, la fixation d'oxygène est de 3 atomes par molécule d'adrénochrome, sans formation de mélanines. Dans l'eau bidistillée, additionnée de l'ion Cu^{++} , sous forme de SO_4Cu , à la concentration de M/100 (correspondant à la concentration en molécules d'adrénochrome) sans addition d'autres sels, l'adrénochrome fixe quatre atomes d'oxygène. L'augmentation de concentration ionique favorise donc d'une façon très importante la réaction d'oxydation, ainsi que la présence d'ions Cu^{++} (catalyseur).

* * *

Pour préciser le point d'attaque de l'oxydation, nous avons d'abord étudié la semicarbazone de l'adrénochrome, dont la fonction CHOH est libre mais qui ne peut pas subir de transposition. La semicarbazone de l'adrénochrome (XVIII) s'est montrée non oxydable.



(XVIII)

Ce fait montre que la fonction alcool secondaire de l'adrénochrome n'est pas directement oxydée, alors que G. COHEN (49) envisageait cette transformation comme la seule hypothèse plausible. En fait, la transposition intramoléculaire en forme phénolique (cf. p.13) représente l'étape préliminaire de l'oxydation catalytique de l'adrénochrome.

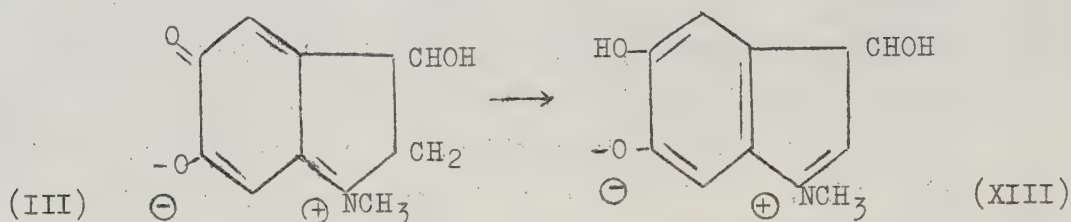
Pour trancher le problème d'une éventuelle oxydation du groupement méthyle à l'azote, bien que celui-ci, en général ne soit pas sensible à une oxydation catalytique, nous avons étudié l'oxydation de la nor-adrénaline. La nor-adrénaline subit une décarboxylation, par dégradation oxydative, identique à celle de l'adrénaline, et présente des limites d'oxydation du même ordre. Ce fait montre que le groupement méthyle lié à l'atome d'azote n'est pas oxydé au cours de la dégradation.

La décarboxylation implique donc l'ouverture d'un des cycles de la molécule. Celle-ci doit, sans doute, se faire sur le noyau benzénique par suite d'une oxydation en quinone des formes phénoliques de l'adrénochrome qui entraîne la disparition du système de doubles liaisons conjuguées, dont dépend la stabilité des noyaux aromatiques (KEMPF (50)). Le pyrogallol, par exemple, aux pH alcalins fixe 3 atomes d'oxygène et subit une décarboxylation : (un demi atome/mol. de pyrogallol) par oxydation catalytique (G. BERTRAND). Par contre aux pH alcalins et même en solution de soude normale, l'isatine n'est pas oxydée indiquant la stabilité du noyau azoté.

La molécule d'adrénochrome est, en quelque sorte "marquée" par l'atome d'azote. Nous avons cherché à préciser sous quelle forme il se trouve dans les produits terminaux de l'oxydation. La recherche des amines volatiles par la méthode de SCLOESING montre que 10 p. 100 de l'azote environ se trouve sous forme volatile. La recherche des amines entraînables à la vapeur d'eau a été négative.

Les faits acquis indiquent un processus complexe de dégradation oxydative, avec ouverture du cycle benzénique permettant de poser l'hypothèse de la formation de dérivés pyrroliques comme terme final de l'oxydation dont nous envisageons l'isolement.

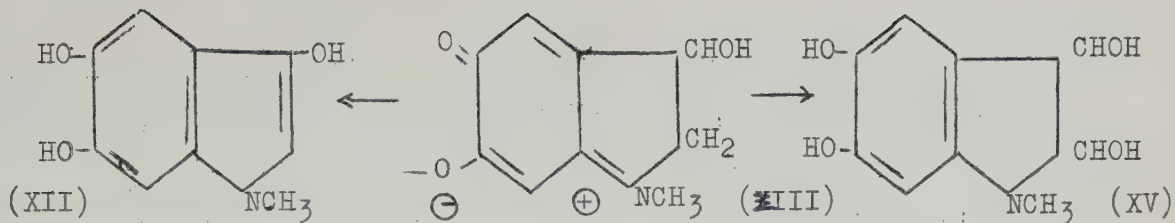
Les résultats de nos expériences nous amènent à proposer une nouvelle interprétation de l'oxydation de l'adrénochrome et, du fait même de l'adrénaline, puisque l'adrénochrome représente un des stades de l'oxydation catalytique ou enzymatique par les phénoloxydases de l'adrénaline. L'adrénochrome (III) en solution aqueuse, subit une transposition en forme phénolique (XIII) par transfert d'un proton.



La forme quinone imine de l'adrénochrome (III) en résonance avec la forme quinonique (II), ou une forme tautomère de structure quinoïde non isolée (cf. chap. : polymères) n'est pas oxydée en solution aqueuse, mais subit sans doute une deshydratation. Cette deshydratation soit intramoléculaire (POLONOWSKI (16)), soit intermoléculaire, correspondant alors à des phénomènes de polycondensation, aboutit à la formation de pigments insolubles : les mélanines. Cette réaction de polycondensation est elle-même suivie d'une réaction d'oxydation. Si la transformation totale en mélanines de l'adrénochrome dans le vide en pH acide permet d'éliminer l'éventualité d'une dismutation de l'adrénochrome (en effet, cette oxydo-réduction de l'adrénochrome nous aurait donné un pourcentage de mélanines de 50 p. 100). Pour les pH plus élevés, où la mélanisation est partielle, ce processus peut interférer.

La forme zwitterion (XIII) isomère de l'adrénochrome peut évoluer, suivant le pH, selon deux voies différentes : 1/- transfert d'un second proton, avec formation du trihydroxy-3-5-6 N-méthylindole (XII) favorisé par la présence d'ions H^+ et 2/- hydratation de (XIII) avec formation du tétrahydroxy-2-3-5-6 N-méthyldihydro-2-3 indole (XV) favorisée par la présence d'ions OH^- . (cf. ch. : structure et transpositions).

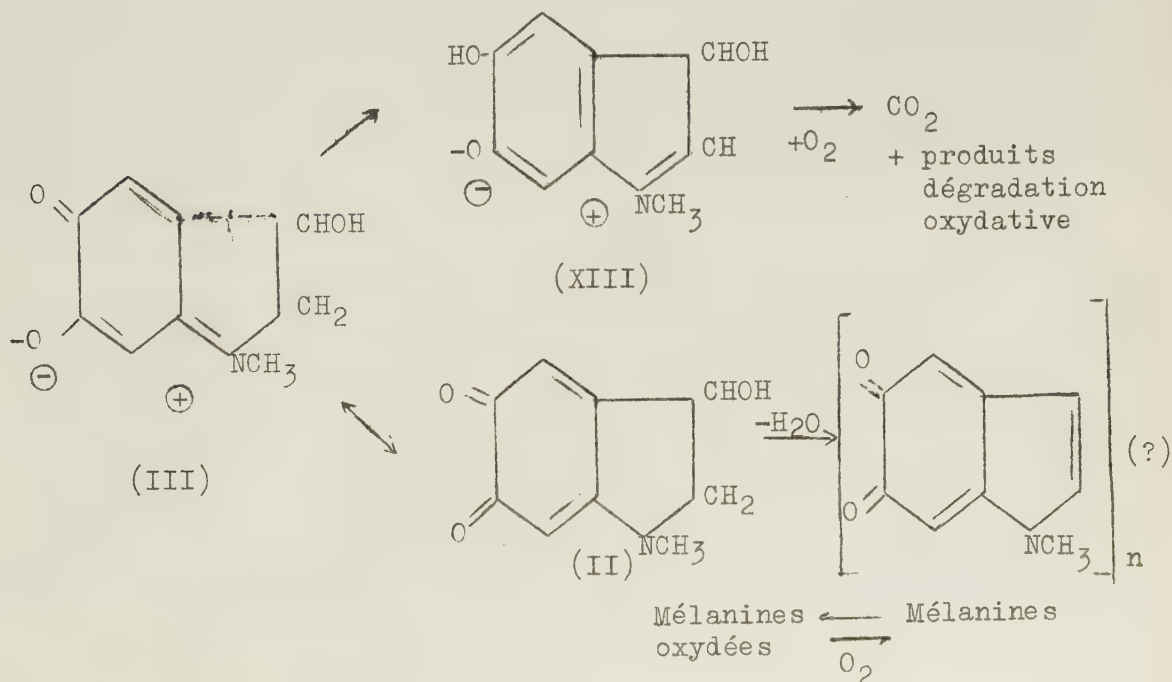
Le passage de la forme quinonique (II) à la forme phénolique (XII) permet par de faibles variations d'énergie de passer d'une forme "oxydée" à une



forme "réduite" pouvant subir une nouvelle oxydation et d'autre part l'hydratation fait apparaître de nouveaux groupements hydroxyles permettant une deshydrogénation ultérieure : une réaction d'hydratation précède souvent une réaction de deshydrogénation. Ces transformations constituent ainsi l'amorce d'une nouvelle étape dans la dégradation de la molécule.

Ces formes phénoliques subissent une oxydation poussée s'accompagnant de décarboxylation. Cette décarboxylation est le témoin de l'ouverture d'un cycle de la molécule indolique, vraisemblablement du cycle quinonique par suite d'une oxydation des fonctions phénoliques. La vitesse d'oxydation de cette forme phénolique augmente avec le pH et doit être en rapport avec la dissociation des groupements phénoliques.

En somme, les premiers stades de la mélanisation correspondent donc à une deshydratation précédant la polymérisation et ceux de l'oxydation à une hydratation précédant la deshydrogénation.



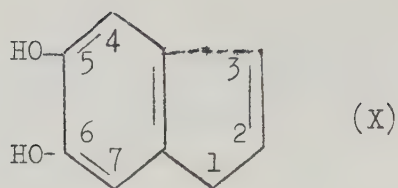
Ce schéma résume le mécanisme de l'oxydation et de la polymérisation de l'adrénochrome, tel qu'il résulte de nos résultats expérimentaux.

Les mélanines ne sont donc pas les produits les plus avancés de l'oxydation de l'adrénochrome et de l'adrénaline. Il existe en réalité deux processus qui peuvent être concomitants : 1/- un processus de polymérisation aboutissant aux mélanines, susceptibles d'une oxydation ultérieure, 2/- un processus d'oxydation avec décarboxylation impliquant la rupture du noyau.

POLYMERES : LES MELANINES

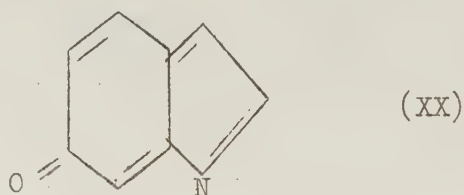
Ce sont les travaux de RAPER sur l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase qui ont prouvé la nature indolique des mélanines (43, 6, 7). Le mécanisme de la polymérisation aboutissant aux mélanines n'est pratiquement pas connu. Les faits expérimentaux acquis sont les suivants : RAPER et WORMALL (43) en 1925 dosent l'azote des mélanines amorphes obtenues à partir de la tyrosine et constatent l'augmentation de pourcentage d'azote par rapport à la tyrosine. Ils interprètent alors cette variation comme due à une oxydation suivie de l'élimination des molécules d'eau dans le processus de condensation, mais cette hypothèse fut formulée en 1923 alors que RAPER n'avait pas encore isolé et identifié les précurseurs des mélanines. Dans une étude manométrique faite en 1930, RAPER et DULIERE (44) montrent que les derniers stades de la mélanisation à partir du dihydroxy-5-6 indole (X) utilisent deux atomes d'oxygène dont le premier donnerait la quinone. Quant au second, RAPER (44) ignore s'il reste ou non sur la molécule (cf. LERNER et FITEPATRICK (63)). HOWARD-MASON (51), en 1948, confirme la formation de la quinone par une étude spectrographique de la mélanisation. Par analogie avec l'adrénochrome, de même degré d'oxydation que la quinone, dérivé du dihydroxy-5-6 indole (X), nous suggérons que la polymérisation se fait à ce stade avec deshydratation et que les mélanines formées subissent alors une lente oxydation.

Récemment, des travaux purement chimiques ont été publiés sur la polymérisation des hydroxyindoles, pour préciser les points où la condensation a lieu en bloquant successivement les différents carbones de la molécule. En 1948, A. ROBERTSON et ses collaborateurs, BEER, CLARKE et KHORANA (52) (53) ont étudié la mélanisation du dihydroxy-5-6 indole (X), le blocage de l'oxhydre en position 6 empêche la polymérisation ; le blocage de l'oxhydre en position 5 ralentit seulement la vitesse de polymérisation ;

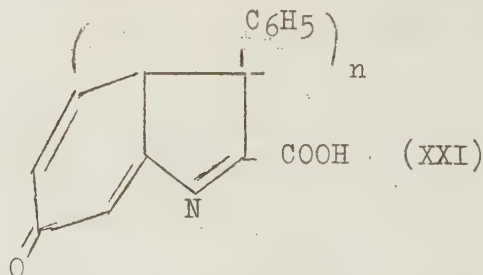


il en est de même pour le blocage des positions 2 et 3. Le blocage simultané des positions 2 et 3 empêche la formation de polymères hautement insolubles, mais il est possible que dans ce cas, l'encombrement de la molécule joue également un rôle. Donc seule, la présence d'un hydroxyle libre en position 6 semble indispensable à la formation des polymères.

En 1949, MORTON et SLAUNWHITE (54) ont étudié la polymérisation des 5 et 6 hydroxyindoles en relation avec la formation des mélanines. Le 5-hydroxyindole est stable, sauf en milieu acide, où il peut subir le même type de polymérisation vinylique que l'indole. Par oxydation douce, le 6-hydroxyindole qui n'a pas été préparé présenterait, d'après MORTON et SLAUNWHITE, une très haute activité de polymérisation en passant à une forme quinométhane. (XX)



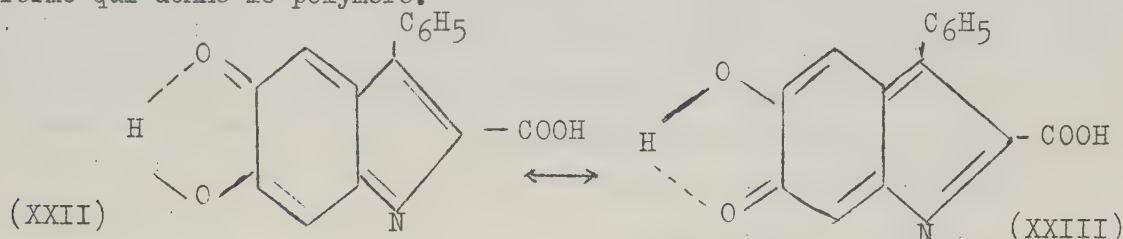
Les quinométhanes, contenant un système vinylique substitué asymétrique, constituent, en effet, une classe de composés hautement polymérisables (SCHLENK et MEYER (55)). MORTON et SLAUNWHITE ont proposé l'unité vinylique suivante :



Le groupement phényle, en position 3 a été introduit pour stabiliser la molécule et en permettre l'isolement. Ces résultats naturellement ne prouvent pas que la polymérisation d'un composé qui a un groupement hydroxyle ou carbonyle en C₅ suive la même voie, mais on peut concevoir qu'il active seule-

ment le processus sans participer directement à la réaction.

MORTON et SLAUNWHITE envisagent également que si l'oxydation donne une quinone imine (XXII) comme stade initial, ce produit doit toujours être équivalent du point de vue degré d'oxydation à une quinométhane (XXIII) pour se polymériser et les deux structures peuvent être représentées comme contribuant à une résonance dans un hybride, la forme (XXII) pourrait être la forme qui donne le polymère.



C'est donc le cas de l'adrénochrome, mais un mécanisme analogue ne peut être confirmé que par une étude approfondie. Cette structure est en accord avec le fait que la semi-carbazone de l'adrénochrome dont les deux valences en C⁵ sont bloquées, ne se polymérise pas : la transposition étant impossible et avec le virage de l'adrénochrome en une forme quinoïde mélanisable.

Différents autres types de polymérisation ont été envisagés par BURTON et DUFFIELD (56) (56 bis), CLEMO et WEISS (57), G. COHEN (48-49), HOWARD - MASON (51). En dehors de BURTON et DUFFIELD qui proposent un système, type "polyphényle", les modes de polymérisation envisagés sont du type indigo ou polyindigoïde ou polyindirubinique. Ce processus n'était pas "entièrement invraisemblable", comme le remarque A. ROBERTSON du fait que l'indole lui-même peut subir une oxydation dans cette position, mais la synthèse du tétrahydroxy-5-6, 5'-6' indigo par HARLEY-MASON (59, 60) a montré que les propriétés de ce composé, de la semiquinone ou de la quinone correspondant sont différentes de celles des mélanines. Il restait cependant la possibilité d'une association en chaîne de plusieurs unités. Les faits suivants permettent de rejeter ces considérations sur la structure des mélanines : le blocage de la position 2 ou 3 où se font les liaisons intermoléculaires type indigoïdes n'empêche pas la polymérisation (A. ROBERTSON). L'adrénochrome

dans le vide se transforme quantitativement en mélanines dont le degré d'oxydation est inférieur aux indigos. Par oxydation, des indigos peuvent d'ailleurs se former, mais sans rapport avec la formation des mélanines.

Le poids moléculaire des mélanines n'est pas connu, en raison des difficultés que posent, en particulier, l'état amorphe et l'insolubilité de ces pigments rendant leur purification difficile. Les granules mélaniques observées par HOWARD - MASON, au microscope électronique ne permettent pas de conclure à une unité macromoléculaire. Il peut s'agir simplement d'un agglomérat de molécules liées par des liaisons physiques. La molécule de mélanines peut ne pas être aussi importante qu'on l'envisage, en général; d'ailleurs l'accroissement de la molécule par polymérisation peut rapidement entraîner une insolubilité dans l'eau et empêcher ainsi une extension des chaînes.

Les mélanines formées à partir de l'adrénochrome sont oxydables. La fixation d'oxygène est approximativement jusqu'à $\text{pH} = 6$ de un demi atome par molécule de monomère. Les mélanines peuvent constituer un système redox:

- mélanines réduites (jaune tan) $\rightleftharpoons$ mélanines oxydées (col. noire) (FIGGE (58)).

* * *

Bien que l'hypothèse de l'unité de structure des mélanines puissent être envisagée, on ne peut encore exclure, dans l'état actuel de la question des processus différents de polymérisation suivant les conditions de la réaction. Cependant, les résultats de nos expériences permettent de réfuter nettement l'opinion suivant laquelle les mélanines origine adrénalinique pourraient présenter des degrés d'oxydation très variables. En réalité, ces pigments exigent seulement pour leur formation la fixation de deux atomes d'oxygène par molécule d'adrénaline et sont des isomères de l'adrénochrome vraisemblablement des produits de polycondensation, d'une structure "quinoïdo". Ces pigments peuvent subir, par la suite, une lente oxydation fixant approximativement un demi atome d'oxygène. Les mélanines de l'adrénaline et celles provenant de la tyrosine, de la dopa, de l'épinine (RAPER (7)), des hydroxy-indoles (A. ROBERTSON et al (52) (53) MORTON et SLAUNWHITE (54)

présentent donc un degré d'oxydation du même ordre. Nous espérons ainsi avoir apporté une contribution au problème plus général de l'unité de structure des mélanines.

PARTIE EXPERIMENTALE

I - CONDITIONS GENERALES DES EXPERIENCES -

SUBSTRATS -

1 - Adrénochrome -

L'adrénochrome utilisé est de l'adrénochrome préparé par oxydation de l'adrénaline par Ag^2O suivant le mode opératoire de Mac CARTHY (25)
P.M. = 179.

Analyse : $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_6\text{N}$	Calculé : N = 7,79 pour 100
Dosage d'azote (Kjeldahl)	: N = 7,19

Malgré cette différence dans le pourcentage d'azote, nous avons exprimé cependant tous nos résultats en adrénochrome anhydre (P.M. = 179), plutôt qu'en hémihydrate P.M. = 188 (GREEN et RICHTER), en raison de l'impossibilité d'une recristallisation très satisfaisante et d'une dessiccation poussée de l'adrénochrome. Dans le cas d'un hémihydrate, les résultats devraient être multipliés par $K = 1,05$.

2 - Adrénaline -

L'adrénaline utilisée est de l'adrénaline base synthétique RHONE-POULENC racémique. L'adrénaline base est mise en solution soit dans de l'acide chlorhydrique 2N soit dans de l'acide sulfurique 2N.

3 - Nor-adrénaline -

La noradrénaline utilisée est le "L-arterenol Bitartrate (WINTHROP-STEARN'S Inc.) cristallisant avec 1 mol. d'eau (TAINTER, TULLAR, LUDUENA)
P.M. = 301. Le produit est mis en solution soit dans ClH 2N, soit dans SO_4H_2 2N

REACTIFS -

1 - Eau distillée -

L'eau utilisée est de l'eau redistillée dans un appareil en pyrex.

2 - Solutions Tampons -

Les solutions tampons utilisées sont, soit les tampons de SORENSEN ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 - 12 \text{ H}_2\text{O} + \text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) soit les tampons phosphate disodique (PO_4HNa_2 , $2\text{H}_2\text{O}$ M/5), acide citrique M/10. (Nous avons utilisé du phosphate disodique cristallisant avec $12 \text{ H}_2\text{O}$ en tenant compte de la différence d'hydratation). Nous avons vérifié que ces deux tampons donnent des résultats comparables.

3 - Soude diluée -

La soude diluée employée est de la soude décarbonatée. On amène à la dilution voulue par de l'eau distillée décarbonatée au moment de l'expérience. La dilution utilisée dans la plupart des expériences est de la soude N à raison de 1 cm^3 pour 1 cm^3 de solution ce qui correspond à $\text{pH} = 14$.

4 - Acide HClH (2N ou SO_4H_2) 2N -

5 - Antiseptique : thymol -

Le pH des solutions tampons est déterminé au pH mètre de BECKMANN en fin d'expérience et comparé avec le pH des solutions utilisées mesurées au début de l'expérience. Les résultats concordent dans ces deux cas.

TECHNIQUES -

Les techniques utilisées ont été celle de THUNBERG pour l'étude qualitative des phénomènes dans le vide, et celle de WARBURG, pour les mesures d'oxydation.

- METHODE DE THUNBERG -

Dans la partie centrale du tube de THUNBERG, on place une solution aqueuse d'adrénochrome (2 mg dans 2 cm^3) ; dans la branche latérale, on place la solution tampon ou l'acide ou la base diluée (2 cm^3). Le vide est alors fait au moyen d'une trompe à eau donnant un vide de $p = 5 \text{ mm}$ et pendant

trois minutes on agite le tube pour évacuer l'air dissous, puis le contenu de la branche latérale est renversé dans la branche centrale. Les tubes sont conservés à la température du laboratoire, à la lumière. En fin d'expérience, on vérifie le vide à l'intérieur du tube.

- METHODE DE WARBURG -

L'appareil de WARBURG, la théorie de l'appareil, la technique expérimentale sont décrits en détail dans "MANOMETRIS METHODS" (DIXON) (61) et "MANOMETRIC TECHNIQUES" (UMBREIT) (62) auxquels nous nous sommes référés.

- Le calibrage des fioles de WARBURG a été fait par la méthode au mercure.

- Thermobaromètres : les thermobaromètres, dans la plupart des expériences ont été remplacés par des témoins comprenant l'ensemble des réactifs sauf la solution à étudier qui a été remplacée par un égal volume d'eau distillée.

- Les fioles utilisées sont des fioles à une ampoule latérale, avec un tube central, dans lequel on place 0,2 cm³ de KOH à 30 % dans les expériences où le gaz carbonique doit être absorbé ; sauf mentions spéciales, les quantités de réactifs sont les suivantes :

- Substrat, dans la chambre principale de la fiole = 1 cm³.

- Tampon ou ClH ou NaOH 2 N (1 cm³) dans l'ampoule latérale, le contenu de l'ampoule latérale est versé au temps 0 de l'expérience dans la chambre médiane.

- Atmosphère = air.

- La vitesse d'agitation de l'appareil est de 110 oscillations par minute ; la cuve thermostatique, sauf mention spéciale est à 37° ± 0,1° C.

- Toutes les expériences ont été faites au moins deux fois.

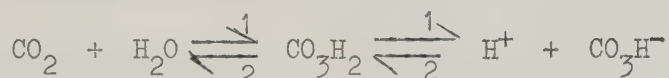
- Les expériences sont faites en atmosphère d'air.

TECHNIQUES DES MESURES -

Mesures des volumes d'oxygène et de gaz carbonique. La méthode utili-

sée pour la mesure des volumes d'oxygène fixés et de gaz carbonique dégagé a été la méthode directe de WARBURG. Cette méthode classique est décrite dans "MANOMETRIC METHODS" (DIXON) (61) et "MANOMETRIC TECHNIQUES" (UMBREIT-BURRIS et STAUFFER) (62).

La mesure des volumes de CO_2 dégagé a toujours été faite à un pH inférieur à 6,3 (PK de la première constante de dissociation apparente de l'acide carbonique) en raison de la rétention de CO_2 aux pH plus élevés ou l'équilibre ci-dessous se déplace vers 1.



Dans les expériences à $\text{pH} \geq 6,3$, on abaisse le pH des solutions au-dessous de 6, en fin d'expérience, par addition d'acide à la solution, ce qui fait que pratiquement la totalité du gaz carbonique dégagé se trouve à l'état de CO_2 (équilibre déplacé dans le sens 2).

Ne disposant pas de fioles à double ampoule latérale et les fioles employées ne permettant pas l'utilisation de "KEILIN CUPS" nous avons dû procéder de la façon suivante : les mesures de CO_2 sont faites en deux temps.

1°/- mesure du CO_2 dégagé à $\text{pH} \geq 6,3$ par une différence de lectures entre deux manomètres, dont l'un contient une solution de potasse à 30 p. 100 dans le tube central pour absorber le CO_2 et l'autre où la potasse est remplacée par un égal volume d'eau.

2°/- mesure de CO_2 retenu dans la solution : les fioles sont ouvertes en fin d'expérience ; l'ampoule latérale est rincée par 1 cm³ d'eau distillée décarbonatée puis remplie avec 1 cm³ d'acide (SO_4H_2 2N). La quantité d'acide ajoutée est de 1 cm³ de façon à amener le milieu en pH nettement acide. Après nouvelle équilibration, l'acide est renversé dans la chambre principale des fioles. Les calculs sont faits en prenant le coefficient de solubilité de CO_2 à 38° et à p = 760 mm Hg qui est égal à 0,517 cm³ de CO_2 par cm³ de solution.

Par des expériences parallèles, nous avons vérifié la valeur de cette technique : le substrat est placé directement en présence du tampon et l'acide est introduit dans l'ampoule latérale. Les résultats obtenus par les deux méthodes concordent.

INFLUENCE DU pH SUR L'OXYDATION ET LA FORMATION DE PIGMENTS
A PARTIR DE L'ADRENOCHROME. VITESSE DE CES TRANSFORMATIONS.

Les expériences sont faites à la température du laboratoire et à la lumière du jour en tubes de THUNBERG. On utilise deux séries de tubes analogues, l'une dans laquelle on fait le vide, l'autre qui reste en communication avec l'air. Chaque série de tubes contient une solution aqueuse d'adrénochrome à 1 pour 1000 (2 cm³) et une solution de pH donné (2 cm³) solution tampon phosphate ou SO⁴H²2N ou NaOH2N) en présence de thymol comme antiseptique, en raison de la durée des expériences (24 à 72 heures). La solution tampon de pH donné placée dans le tube latéral est versée au temps 0 de l'expérience dans la solution d'adrénochrome. On note chaque changement de coloration et la formation de pigments - les résultats sont condensés dans le tableau I.

Les expériences faites dans le vide montrent la conversion du pigment rouge en une forme jaune. Aux pH inférieurs à 6, apparaît, à cette concentration des pigments dont la quantité augmente avec la chute du pH.

La réaction du noyau indole par le réactif d'ERLICH donne une coloration rouge violette.

La réaction des oxhydriles par le réactif au Cl₃Fe en milieu acide donne une coloration violet fugace.

Les expériences faites au contact de l'oxygène de l'atmosphère indiquent des transformations analogues avec cette seule différence que la phase soluble prend une coloration brun jaune. Par admission de l'air dans les tubes où le vide a été fait en fin de réaction, on obtient un aspect identique des deux séries.

T A B L E A U 1

Evolution dans le vide, en fonction du temps et du pH, des solutions d'adrénochrome - Technique de THUNBERG.

Temps	pH 0	2	3	4	5	6	8	14
0 h	Bleu-brun	Rouge initial (zone sans transformation apparente)						Jaune fluorescence verte
0.30	Bleu vert							
0.45	Incolore Ppté +++	Rouge sombre	Rouge sombre				Orange clair	
1.30		Brun vert Ppté colloï- dal +++						
3.			Rouge clair Ppté +	Rouge trouble		Rouge clair	Jaune clair	
6.			Rouge clair jaunâtre Ppté +					
20.				Rouge orangé Ppté +		orangé	(Fin de réaction apparente)	
26.			Jaunâtre Ppté ++			Jaune d'or Ppté (tra- ces)		
72.				Jaune Ppté ++	Orange clair Ppté +			

T A B L E A U 2

Evolution à l'air, en fonction du temps et du pH des solutions d'adrénochrome -- Technique de THUNBERG
S - Partie supérieure tube - I - Partie inférieure tube -

Temps	pH 0	2	3	4	5	6	8	14	
0	bleu brun	Rouge initial (zone sans transformation apparente)							Jaune fluorescen- ce verte
0.30								Jaune foncé	
0.45	incolore +++	Rouge sombre							
1.30		Brun Ppté colloidal +++	Rouge trouble				S. Rouge I. Rouge clair	Jaune brun	
3		Brun Ppté colloidal +++	S. Rouge trouble I. Rouge clair			Rouge clair	S. Jaune brun I. Orangé		
6			Rouge jau- nâtre Ppté +	Rouge trouble	Rouge trouble	S. rouge clair I. orangé	S. Brun I. Jaune	Brun	
20			Brun jaunâtre Ppté ++	S. rouge I. orangé Ppté +	S. rouge I. orangé foncé Ppté +	S. jaune brun I. Jaune			
26				S. Rouge I. Jaune Ppté +					
72			Brun jaunâtre Ppté ++	Brun Ppté ++	Brun Ppté +	Brun Ppté (traces)	Brun		

OXYDATION DE L'ADRENOCHROME EN FONCTION DU pH à 37°.

- Technique de WARBURG.

- Adrénochrome : $1 \cdot 10^{-3}$

a = atomes d'oxygène fixés par molécule d'adrénochrome

b = molécules de CO_2 dégagées par molécule d'adrénochrome.

(Valeurs expérimentales limites en fin d'expérience)

pH	Durée exp. en heures	a	b	pH	Durée exp. en heures	a	b
0	65	0,53	0	5,1	120	4,9	1,28
2,5	73	1,17	-	5,7	97	5,2	1,3
3,38	120	1,46	-	5,9	94	5,16	1,13
3,75	120	1,75	0,28	6	93	5,17	1,0
3,9	93	1,35	0,23	6	114	5,1	1,09
4,3	97	1,4	0,12	6	94	5,35	1,24
4,5	114	1,58	0,13	6	94	5,66	-
4,7	97	2,3	0,32	7,5	114	5,2	1,17
5,1	93	4,37	0,77	7,5	93	5,17	1,34
5,1	97	4,7	0,87	14	4	5,42	-

OXYDATION DE L'ADRENOCHROME EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

- Technique de WARBURG.
- Adrénochrome : $1 \cdot 10^{-3}$
- Résultats exprimés en atomes d'oxygène par molécule adrénochrome

pH	0	3,7	6	7,5	14
20° valeurs exp.	0,16	0,67	3,97	4,06	5,38
37° valeurs moyennes	0,56	1,4	5,16	5,16	5,64

OXYDATION DE L'ADRENOCHROME EN FONCTION DES CONCENTRATIONS

- Technique de WARBURG.
- Résultats exprimés en atomes d'oxygène/mol. adrénochrome
- Durée de l'expérience : 24 heures. Temp. = 37°
- Les signes + indiquent des quantités relatives de mélanines en fin d'exp.

pH	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2,5}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3,5}$	$1 \cdot 10^{-4}$
3	0,45 +++	0,42 +++	0,42 +++	0,39 +++	
6	1,59 +++	2,37 +	3,12 -	3,28 -	
10	1,56 +++	2,83 +	3,53 -	3,85 -	4,0 -

MELANISATION DE L'ADRENOCHROME EN FONCTION DU pH de la TEMPERATURE

- Solutions employées : CLH 2N -

- pH = 1 et 1,5 : Tampon de CLARKE & LUBS (CLH N/5, CLK N/5).

- pH $\Rightarrow$ 2 : Tampon $\text{PO}_4 \text{HNa}_2$ M/5, acide citrique M/10.

- Les expériences sont faites dans des Erlenmeyers contenant :

- Solution aqueuse d'adrénochrome

- Solution tampon ou CLH = 20 cm³ + sol.alcool.thymol = 0,1 cm³.

- La durée des expériences est de 120 heures. Les Erlenmeyers sont agités dans un thermostat. En fin d'expérience, le liquide est filtré. (La formation d'un précipité colloïdal a empêché le traitement de quelques solutions). Le liquide est filtré. Le précipité est séché jusqu'à poids constant et pesé.

pH	10°	37°
CLH N	32	23
1	-	-
1,5	24	-
2	-	-
3	26	21
3,5	26	20,5
4	23	19,5
4,5	22,5	15
5	13	3
5,5	5,5	0
6	2	0
7	1	-
8	0	-
Poids initial d'adrénochrome (en mg)	34	25

NOTE : Dosage N des mélanines (méthode de KJELDAHL)

N = 7,12 N = 7,49

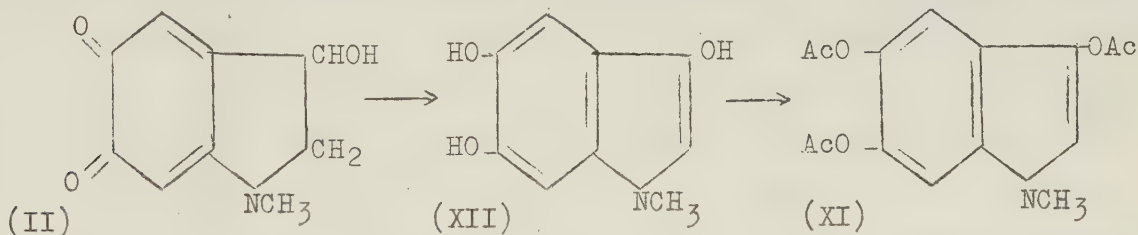
En raison de l'état amorphe des mélanines, de leur purification impossible et de leur légère oxydabilité, ces résultats d'analyse sont donnés seulement à titre indicatif.

R É S U M É

R E S U M E

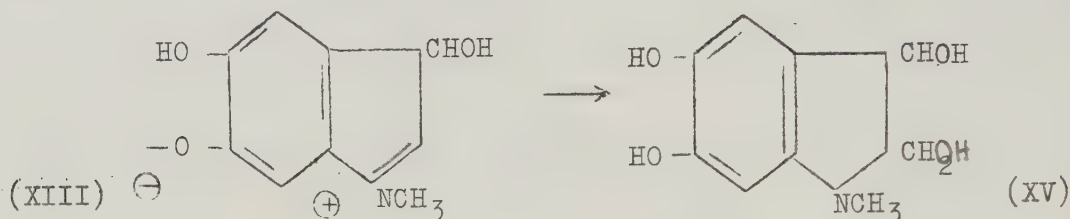
Les recherches biochimiques et chimiques qui font l'objet de cette thèse ont été orientées, en raison du rôle que l'adrénochrome jouerait dans les phosphorylations, dans les systèmes d'oxydo-réduction, dans l'inversion des effets de l'adrénaline. C'est pourquoi, nous nous sommes attachés aux réactions de transposition, d'hydratation, d'estérification, de réduction, d'oxydoréduction, d'oxydation, de décarboxylation, de polymérisation qui sont les grands types de réactions biologiques. C'est pourquoi, les réactions de préférence ont été étudiées en milieu aqueux polaire et ionisé, propriétés caractéristiques du milieu cellulaire, et leur mécanisme envisagé dans ces mêmes conditions.

I - Partie - Nous avons étudié l'estérification de l'adrénochrome. Par acétylation, nous avons isolé le triacétoxy-3-5-6 N-méthylindole (XI), qui implique une transposition intramoléculaire préalable en forme phénolique (XII) : le trihydroxy-3-5-6 N-méthylindole.



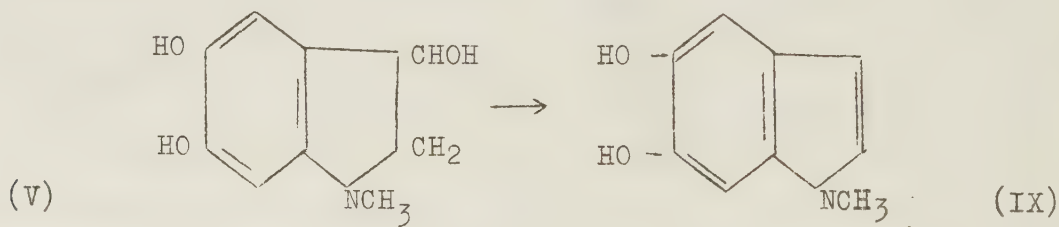
D'autre part, nous avons montré que l'on pouvait, en tubes de THUNBERG, dans le vide, en milieu ionisé, obtenir une décoloration totale des solutions aqueuses d'adrénochrome. Ces faits, rapprochés d'autres constatations expérimentales, nous ont amené à une conclusion analogue à celle de RAPER pour la décoloration du pigment rouge formé au cours de l'oxydation de la tyrosine en présence de tyrosinase : l'adrénochrome (II), en solution aqueuse, subit une transposition en forme diphenolique incolore (XII) : le trihydroxy-3-5-6 N-méthylindole. La réaction est irréversible. Selon les conditions de milieu

cette réaction peut conduire uniquement à la forme polaire intermédiaire (XIII), ou à la formation d'un hydrate : tétrahydroxy-2-3-5-6 N-méthyl-dihydro-2-3 indole (XV).

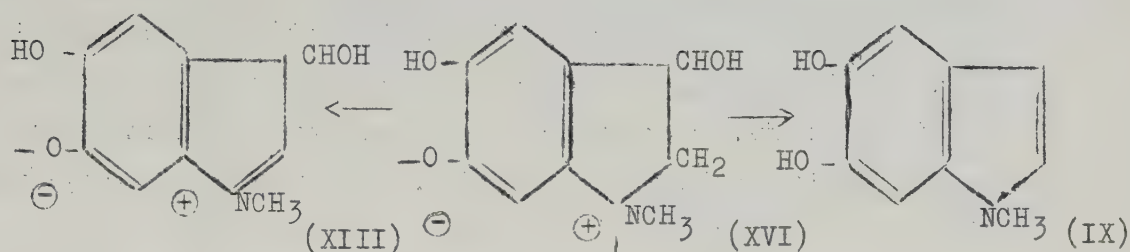


C'est cette réaction de transposition qui nous a permis d'envisager sous un angle nouveau, le problème de la réduction, de l'oxydo-réduction et surtout celui de l'oxydation et de la mélanisation de l'adrénochrome.

II - La réduction a été précédemment étudié par HARLEY-MASON qui a obtenu, par réduction catalytique ou chimique la fixation d'un seul atome d'hydrogène par molécule d'adrénochrome. Nous avons repris cette étude et trouvé que l'adrénochrome, par réduction avec l'hydrogène - Pt, fixe un atome d'hydrogène. Par contre, la réduction par l'hydrosulfite de sodium correspond à la fixation de deux atomes d'hydrogène. Dans le premier cas, on obtient en quantités sensiblement égales un produit de déshydratation du leuco-adrénochrome (V), le dihydroxy-5-6 N-méthylindole (IX) et un isomère phénolique de l'adrénochrome, le zwitterion(XIII). Dans le second cas, la transformation en (IX) est totale.



Ces résultats nous ont amené à une conception plus large du mécanisme de la réduction de l'adrénochrome. En milieu très faiblement réducteur, l'adrénochrome subit une simple auto-réduction intramoléculaire. En milieu plus réducteur, l'adrénochrome est rapidement réduit en donnant, par fixation d'un atome d'hydrogène, une semi-quinone (XVI) déjà postulée par HARLEY-MASON. Cette semi-quinone, radicale instable, se dismute d'une part en ion dipolaire (XIII), d'autre part en leucoadrénochrome (V) qui subit immédiatement une



deshydratation en (IX). Par contre, en milieu très réducteur, cette semi-quinone (XVI) fixe un second atome d'hydrogène avec formation de (IX) par deshydratation de (V). La réduction d'adrénochrome dans ces conditions est irréversible.

Ces résultats s'opposent aux conclusions de GREEN et RICHTER. Pour ces auteurs, l'adrénochrome peut subir le passage réversible de la forme colorée à la forme réduite incolore. Pensant que l'action des réactifs chimiques pouvait être responsable de la déshydratation du leuco-adrénochrome, nous avons essayé d'obtenir la réversibilité en utilisant des réducteurs biologiques. Nous avons bien obtenu la décoloration du pigment rouge, mais il nous a été impossible d'obtenir sa recoloration à l'air. Un examen critique des résultats de ces auteurs nous a montré que, dans leurs conditions expérimentales, l'apparente réversibilité de cette réaction était due, notamment, à la présence dans le système de molécules d'adrénaline non encore transformées qui subissent une oxydation directe en adrénochrome et non à une réoxydation du leucodérivé.

Il est impossible de préciser la forme exacte sous laquelle l'adrénochrome existe dans un système redox qui apparaît éminemment instable. Mais la transposition de l'adrénochrome et, en particulier, l'obtention de deux degrés différents de réduction en présence d' H_2 - Pt d'une part, d'hydrosulfite de l'autre, nous ont conduit à faire un rapprochement avec d'autres molécules azotées (aneurine par ex.) jouant un rôle important comme transporteurs d'hydrogène dans les cellules plutôt qu'avec un système redox du type quinone-hydroquinone et à poser l'hypothèse d'une structure chimique permettant à l'adrénochrome de jouer éventuellement le rôle de coenzyme.

III - La question la plus confuse, dont le mécanisme n'avait reçu jusqu'ici aucune explication satisfaisante était celle de la mélanisation de l'adré-

nochrome et de ses rapports avec l'oxydation de ce produit. Ces deux phénomènes : oxydation et polymérisation avaient été déjà observés l'un et l'autre, mais la synthèse des résultats de ces deux types de recherches n'avait jamais été faite. On considérait classiquement les mélanines comme le terme ultime de l'oxydation de l'adrénaline. Nous avons repris complètement cette étude en prenant comme point de départ la transposition en solution aqueuse de l'adrénochrome)- Une étude qualitative, en fonction du pH, des phénomènes qui se passent en cours de la mélanisation nous a montré que, dans le vide, l'adrénochrome se mélanisait totalement aux bas pH et que, par contre, aux pH élevés, il se transformait totalement en un pigment fluorescent. A l'air, les transformations étaient analogues, mais la fluorescence disparaissait et le pigment devenait brun-jaune.- b)- Une étude quantitative de l'oxydation de l'adrénochrome, faite en nous servant de la méthode de WARBURG, nous a montré que la fixation d'oxygène croît avec le pH et s'accompagne d'une décarboxylation. Cette décarboxylation n'avait été signalée jusqu'ici que par WELCH (1934).- c)- Nous avons également étudié l'action de la température, de la concentration ionique, et de la concentration de l'adrénochrome sur les limites de la mélanisation et de l'oxydation.

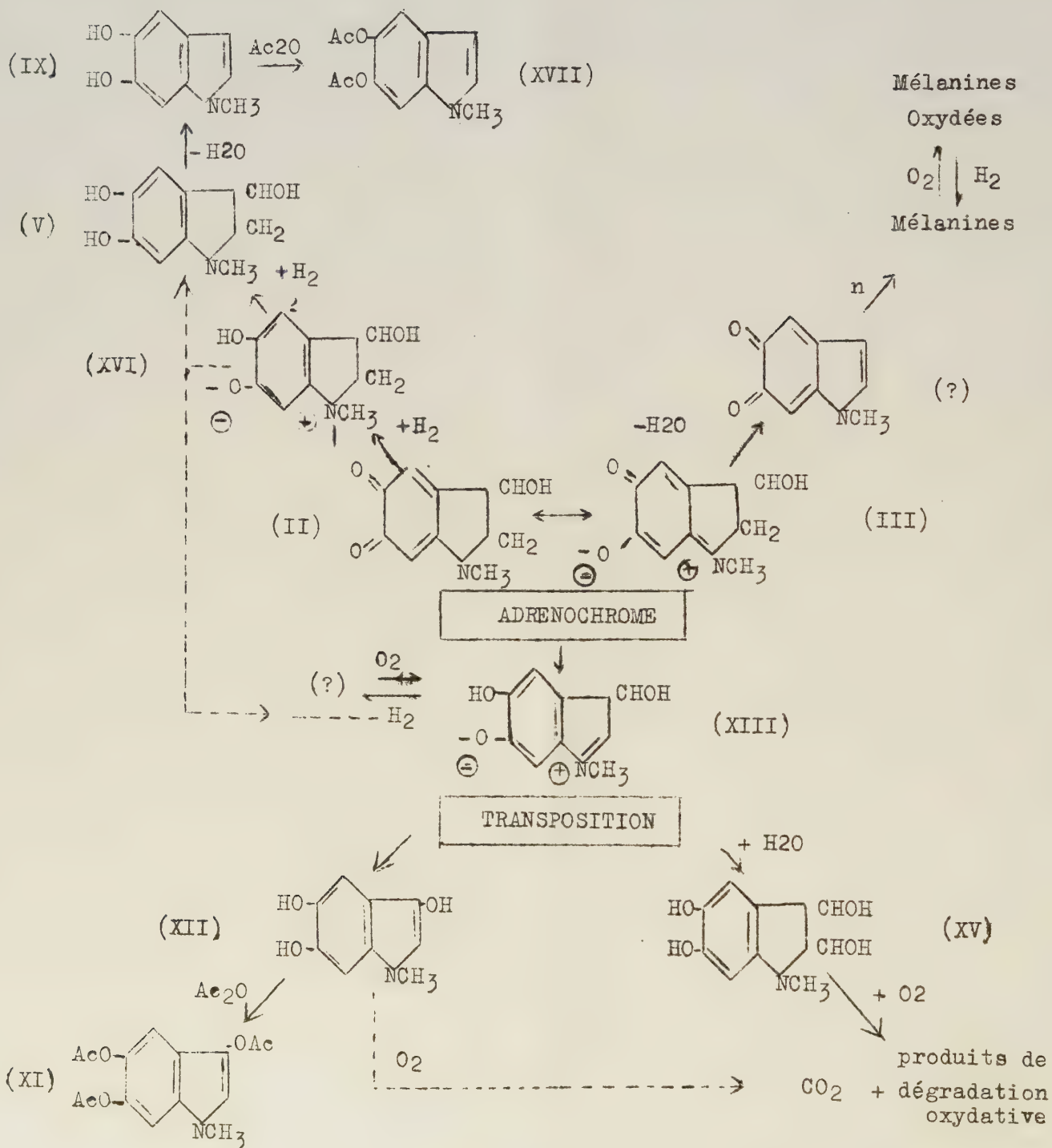
Cette étude expérimentale nous a permis d'aboutir à une théorie nouvelle de la mélanisation de l'adrénochrome, donc de l'adrénaline dont il est un des premiers stades de l'oxydation catalytique : la forme quinonique de l'adrénochrome se transpose en forme phénolique avec une vitesse variable suivant les conditions du milieu.

1/- La forme quinonique n'est pas oxydée, mais se polymérise (vraisemblablement par polycondensation) et aboutit à des pigments insolubles de structure polyvinylique : les mélanines. Ces pigments sont susceptibles d'une légère oxydation ultérieure ($\frac{1}{2}$ atome d'oxygène par molécule monomère).

2/- La forme phénolique par contre, est très oxydable et fixe environ six atomes d'oxygène s'accompagnant du dégagement d'une molécule de CO_2 . Nous avons vérifié expérimentalement que le groupe méthyle à l'azote n'est pas oxydable : la nor-adrénaline subit en effet la même décarboxylation. Le dégagement de CO_2 implique donc l'ouverture du noyau; la rupture doit porter sur le cycle quinonique dont on connaît la fragilité. Ces résultats permettent de poser comme hypothèse de travail la formation d'un dérivé pyrrolique, terme final de l'oxydation de l'adrénochrome.

REDUCTION

POLYMERISATION



Mélanines

Oxydées

$O_2 \uparrow$
 $H_2 \downarrow$

Mélanines

ESTERIFICATION

OXYDATION

B I B L I O G R A P H I E



B I B L I O G R A P H I E

1. ENGELHARDT W.A. et SAKOV N.E.
Biochimia 8, 35, (1943) cité d'après WAJZER
(ref. 2).
2. WAJZER J.
Bull. Soc. Chim. biol. 28, 345, (1946).
3. GREEN D.E. et RICHTER D.
Biochem. J. 31, 596, (1937).
4. BACQ Z.M. et HEIRMAN P.
Arch. Intern. Physiol., 50, 153, (1940).
(revue de la question : Adrénoxine).
5. MINZ B. et PLOTKA C.
C.R. Acad. Sci., 225, 697, (1947).
6. RAPER H.S.
Biochem. J., 21, 89, (1927).
7. DULIERE W.L. & RAPER H.S.
Biochem. J., 24, 259, (1930).
8. HARLEY-MASON J.
Experientia, IV/S, 307, (1948).
9. CHAIX P., CHAUVET J. & JEZEQUEL J.
Biochem. et Biophys. acta, 4, 471, (1950).
10. BOUVET P.
Etudes sur l'oxydation de l'adrénaline.
Thèse Doct. Sci. Nat. Paris 1948.
11. VEER W.L.C.
Rec. Trav. chim., Pays Bas, 61, 637, (1942).
12. WAJZER J.
Bull. Soc. Chim. Biol., 28, 341, (1946).
13. VULPIAN
C.R. Acad. Scien., 43, 663, (1856).
14. LAVOLLAY J.
L'oxydation des diphénols, en particulier de
l'adrénaline. Thèse. Doct. Sci. Phys.,
Paris, (1942).
15. SCHAPIRA
Contribution à l'étude physico-chimique et
biochimique de l'adrénaline. Thèse Doct. Sci.
Phys., Paris, (1946).

16. POLONOVSKI M. Elements Bioch. med. MASSON Ed., Paris, (1942) p. 412.
17. DEROUAUX C. Arch. Intern. Pharmacodyn., Therap. 69, 205, (1943).
18. COHEN G.N. Etude biochimique de l'oxydation de l'adrénaline Origine et Structure des mélanines, Thèse Doct. Sci. Paris (1945).
19. BALL F.G. & CHEN T.T. J. Biol. Chem., 102, 691, (1933).
20. UTEVSKII A.M. Nouvelles biologiques soviétiques, 2, 148.
- 20bis. UTEVSKII A.M. & OSINSKAYA V.O. Med. exptl. (Ukraine), 1, 1, 1940 d'après C.A. 35, 4043 (1941).
21. VERLY W. Arch. Inter. Physiol., 56, 1, (1948).
22. NEF. Ann. Chem., 237, I, (1887) cité d'après BALL & CHEN (ref. 19).
23. RANGIER M. C.R. Ac. Sci., 220, 246, (1945).
24. GIJON J.R. Trab. Inst. Cajal. Invest. Biol. Sec. fisiol., 3, 73, (1945).
25. MAC CARTHY C.L. Chem. & Indust., 55, 435, (1946).
26. ELLIS S. J. Pharmacol. exper. Therap., 79, 364, (1943).
27. WILLSTATTER R. & PFANNENSTIEL A. Ber. 37, 4744, (1904).
28. BRACONNIER F., LE BIHAN H. & BEAUDET C. Arch. intern. Pharmacodyn. Therap., 69, 181, (1943).
29. RICHTER P. & BLASCHKO H. J. Chem. Soc., London, 601, (1937).
30. EHRLÉN I. Farm. Revy 48, 485 (1948) d'après C.A. 43, 9135, (1949).
31. BEAUVILLAIN A. & SARRADIN J. Bull. Soc. Chim. Biol. 30, 478, (1948).
32. GADDUM J.H. & SCHILD H. J. Physiol. 80, 9P, (1934).

33. UTEVSKII A.M. Advances in Modern Biology. 18, 45, (1944)
cité d'après WEST (ref. 34).
34. WEST G.B. Brit. J. Pharmacol, Chemotherap. 2, 121, (1947).
35. HELFERICH & KLEIN Ann. Chem. 450, 225, (1926).
36. BERGEL F. & MORRISON A.L.
J. Chem. Soc. London, (1943), 48.
37. WIESNER K. Biochem. Soc. 313, 48, (1942-1943).
38. GREEN D.E. & BROSTEAUX J.
Biochem. J., 36, 1489, (1936) (cf.p. 1500).
39. GREEN D.E. Biochem. J., 36, 2095, (1936).
40. WATERS W. Chemistry of Free Radicals, chap. XII,
(Oxford, 1946).
41. WILLIAMS R.R. Ergebnisse der vitamin und Hormon schung,
I, 213, (1944).
42. HOSKIN-HEARD R.D. & RAPER H.S.
Biochem. J. 27, 36, (1933).
43. RAPER H.S. & WORWALL A.
Biochem. J., 19, 84, (1925).
44. RAPER H.S. J. Chem. Soc., London, (1938), 125.
45. BLASCHKO & SCHLOSSMANN J. Physiol., 94, 19 P, (1938).
- 45 bis. BLASCHKO & SCHLOSSMANN J. Physiol., 98, 130, (1940).
46. WELCH A.D. Amer. J. Physiol., 108, 360, (1934).
47. CHAIX P. MORIN G.A. & JEZEQUEL J.
C.R. Ac. Sci., 230, 790, (1950).
48. COHEN G.N. C.R. Acad. Sci., 220, 927, (1945).
49. COHEN G.N. C.R. Acad. Sci., 220, 796, (1945).
50. KEMPF Ber. (1906), 39, 3715.
- 50 bis. BERTRAND G. C.R. Acad. Sci., 120, 269, (1895).
51. HOWARD-MASON J. Biol. Chem., 172, (83), 1948.
52. BEER R.J.S., CLARKE K., KHORANA H.C., ROBERTSON A.
J. Chem. Soc. (1948), 2061, London.

53. BEER R.J.S., CLARKE K., KHORANA H.C., ROBERTSON A.
J. Chem. Soc., London, (1948) 2223.
54. MORTON A.A. & SLAUNWHITE W.R.
J. Biol. Chem., 179, 259, (1949).
55. SCHLENK W., MEYER E. Ber. 52, 8, (1919) d'après MORTON et SLAUNWHITE
(ref. 54).
56. BURTON & DUFFIELD J. Chem. Soc. London (1949), 48.
- 56bis. BURTON H. Chemistry and Industry, 313, (1948).
57. CLEMO & WEISS J. Chem. Soc. (1945), 702.
58. FIGGE F.H.J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41, 127, (1939).
59. HARLEY-MASON J. Nature, 159, 338, (1947).
60. HARLEY-MASON J. J. Chem. Soc., London, (1948), 1244.
61. DIXON Manometric Methods (Cambridge) (1943).
62. UMBREIT W.W. BURRIS R.S., STAUFFER S.F. -
Manometric techniques and related methods for
the study of tissue metabolism.
(Burgess publ. Co. Minneapolis. Minn.).
63. LERNER A.B. & FITZPATRICK
Biochemistry of melanin formation Physiol.
Rev. 30, I, (1950).
-

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LA VITAMINE B 12

Vu et approuvé :

Paris, le 19.....

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

A. CHATELET.

Vu

et Permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

J. SARRAILH.

